

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

*ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ,
БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ*

***СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ
БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОЛОГИИ
ПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ***

СБОРНИК НАУЧНЫХ ТРУДОВ

Том XXXIX

ВНИИФБиП с.-х. животных



Боровск, 2000

ББК 28:45
УДК 636:612:577.1

Т. 39. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сборник научных трудов. Том XXXIX. Боровск, 2000. – 407с.

В сборник включены экспериментальные и обзорные статьи по биотехнологическим аспектам животноводства; физиологии, биохимии и морфологии животных, выращиваемых на мясо; пищеварению, обмену веществ и продуктивности молочных коров.

Редакционная коллегия: Матвеев В.А., Медведев И.К., Рябых В.П., Тараканов Б.В., Черепанов Г.Г.

© Коллектив авторов, 2000
© ВНИИФБиП с.-х. животных

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ЖИВОТНОВОДСТВА**

**ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ,
ВКЛЮЧАЮЩЕЙ ГЕН ГРАНУЛОЦИТ-
КОЛОНИИСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА И
ФЛАНКИРУЮЩИЕ РАЙОНЫ ГЕНА α S1–КАЗЕИНА БЫКА**

Г.А. Дворянчиков, Л.Б. Иванова, В.Г. Шевченко
Лаборатория молекулярной биологии

Проведен подбор структур праймеров и оптимизированы условия амплификации структурной части гена гранулоцит-стимулирующего фактора человека (Г-КСФ). Амплифицированный фрагмент ДНК размером 1505 п.н. был выделен из агарозного геля и проклонирован в плазмидный вектор, содержащий фланкирующие районы гена α S1-казеина быка по BstEII и NcoI сайтам рестрикции. Полное секвенирование клонированной последовательности свидетельствует о наличии нуклеотидной замены С/Т в области второго интрона гена. Созданная генно-инженерная конструкция может быть использована при получении трансгенных сельскохозяйственных животных – продуцентов биологически активного Г-КСФ человека.

Введение

К настоящему времени накоплен обширный материал, свидетельствующий о возможности тканеспецифической экспрессии генов биологически активных веществ в молочной железе трансгенных животных (2, 8, 9). Принципиальная возможность получения с молоком этих веществ обусловлена механизмом тканеспецифической экспрессии, определяемой регуляторными последовательностями генов молочных белков (3, 4, 10). В ряде работ продемонстрирована не только специфичность экспрессии чужеродных генов в молочной железе, но и был сделан вывод, что молочная железа трансгенных животных может служить в качестве естественного биореактора чужеродных белков.

Для многих белков, имеющих терапевтическое значение, такая задача не решена. В первую очередь это относится к рекомбинантным препаратам, стимулирующим рост и дифференцировку клеток в организме, к которым относятся эритропоэтин, интерлейкин, гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека. Г-КСФ стимулирует многочисленные функции иммунной системы человека. Он является ос-

новным фактором, регулирующим пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов, используется для лечения анемий различной этиологии, повышает эффективность трансплантации костного мозга.

Уровень экспрессии чужеродного гена в молочной железе трансгенных животных в большинстве экспериментов является невысоким, что предполагает дальнейший поиск оптимальных генных конструкций для проведения работ в этом направлении. В значительной степени экспрессия трансгена зависит от специфических особенностей переносимого гена. Так, в одной и той же векторной кассете рекомбинантный ген эритропоэтина человека экспрессировал по крайней мере в 1000 раз ниже, чем ген ГМ-КСФ (7). Следует отметить, что круг генов, используемых в данных экспериментах, не велик. И получение трансгенных животных с новым геном представляет большой интерес не только с практической точки зрения, но и в смысле более глубокого понимания механизмов тканеспецифической экспрессии трансгена в клетках молочной железы.

К настоящему времени отсутствуют данные о получении трансгенных животных с геном Г-КСФ человека. Продукт этого гена относится к числу наиболее перспективных белков, имеющих терапевтическое значение.

Материал и методы

Объектом исследований являлась последовательность гена Г-КСФ человека. Амплификацию проводили в условиях рекомендованных для ТАq-полимеразы с некоторыми модификациями. Временные и температурные параметры амплификации были подобраны экспериментально в зависимости от структуры используемых праймеров. Гидролиз ДНК и лигирование проводили стандартными методами (8). Для проведения рестрикции брали 0,2-1 мкг плазмидной или космидной ДНК. Добавляли к раствору ДНК соответствующий буфер 10-кратной концентрации. Затем добавляли рестриктазу из расчета 1 ед. фермента на 1 мкг ДНК. Доводили объем раствора до 30 мкл и инкубировали пробы 2 часа при 37°C. В зависимости от того, какие концы имеют фрагменты ДНК, реакцию лигирования проводили в различных условиях. Молярное отношение вектора и вставки составляло 1:2, концентрация ДНК в реакционной смеси составляла 20 мкг/мл. Лигазу добавляли из расчета 0,5 ед. на 1 мл. Для отбора необходимых рекомбинантов лигазную смесь брали на трансформацию клеток *E. coli*. Трансформацию проводили по методу Кушнера (9) с применением хлористого кальция и хлористого рубидия.

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* щелочным методом (10). Выделенную плазмидную ДНК растворяли в буфере TE и очищали с помощью стеклянных микрогранул. Секвенирование плазм-

мидной ДНК проводили в соответствии с рекомендацией к секвенирующему набору фирмы «Promega».

Результаты и обсуждение

Традиционным подходом при выделении и клонировании новых генов является скринирование геномных библиотек. В ряде случаев эту трудоемкую и достаточно сложную процедуру удается избежать благодаря использованию преимуществ ПЦР-амплификации. Аналогичный подход был продемонстрирован нами ранее на примере гена гормона роста быка. Как и в случае с геном гормона роста быка, была предпринята попытка амплифицировать последовательность протяженностью от иницирующего до терминирующего кодона гена.

Последовательность гена Г-КСФ человека была получена с помощью ПЦР-амплификации, путем использования геномной ДНК человека в качестве матрицы. Подбор структур синтетических олигонуклеотидов проводился на основании опубликованной последовательности этого гена. Локализация праймеров в последовательности гена Г-КСФ человека соответствовала положению -2 нуклеотида для прямого праймера и +1488 нуклеотида для обратного, относительно сайта инициации транскрипции гена. Прямой праймер включал в себя стартовый atg кодон, а обратный праймер содержал терминирующий кодон гена Г-КСФ человека. При этом в состав олигонуклеотидов вводили дополнительные последовательности, содержащие сайты узнавания для рестриктаз BstEII и NcoI в обоих 5'- и 3'-концах амплифицированного фрагмента. Синтезированные праймеры были представлены олигонуклеотидами следующей структуры:

GC1 - tat ggt cac cat ggc tgg acc tgc cac cca ga

GC2 - atg tcc atg gtc agg gct ggg caa ggt ggc gta

Для подтверждения специфичности реакции амплификации был проведен рестриктный анализ полученного фрагмента ДНК (рис.1). На 4-7-й дорожках можно видеть фрагменты ДНК, полученные в результате обработки первичного амплификата рестриктазами PvuII, BstEII и NcoI. В соответствии с сиквенсом гена Г-КСФ человека ДНК амплифицированного фрагмента при воздействии на нее рестриктазой PvuII должна разделиться на 5 фрагментов длиной 620, 355, 257, 234 и 20 п.н. Наличие предсказанных фрагментов четко указывает на присутствие ожидаемых сайтов рестрикции внутри амплифицированного фрагмента (4-я дорожка). К сожалению внутри амплифицированного фрагмента имеется один сайт для рестриктазы NcoI и еще один сайт для этой рестриктазы в области прямого праймера, то есть в самом начале гена. Тем не менее, нами был введен еще один сайт для рестриктазы NcoI в конце обратного праймера, что было вызвано особенностями структуры вектора, в котором проходило клонирование.

С целью повышения эффективности клонирования необходимого фрагмента ДНК мы проводили неполный гидролиз первичного продукта амплификации. Амплифицированный фрагмент после проведения неполного гидролиза и элюции из геля клонировали по указанным сайтам рестрикции в плазмиду, включающую регуляторные последовательности гена $\alpha s1$ -казеина быка. Для этого удаляли из нее внутренний BstEII/NcoI фрагмент, от которого освобождались при элюции. Вместо него встраивали фрагмент гена Г-КСФ.

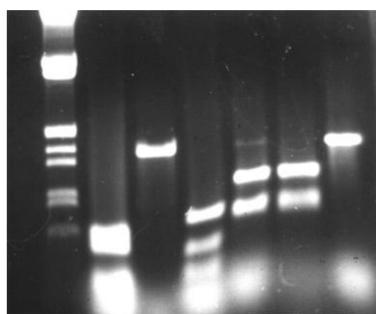


Рис. 1. Рестрикционный анализ гена Г-КСФ человека, амплифицированного с использованием праймеров GC1 и GC2.

1 - ДНК фага лямбда, рестрицированная EcoRI + HindIII; 2 - ДНК pBR322, рестрицированная NaeIII; 3 - не гидролизованный амплификат; 4,5,6,7 - амплификат гидролизованный рестриктазами: 4 - PvuII, 5 - BstEII+NcoI, 6 - NcoI, 7 - BstEII

1 2 3 4 5 6 7

Клонированный фрагмент проверяли секвенированием на присутствие возможных ошибок при амплификации и клонировании. С помощью праймеров GC1 и GC2, а также четырех олигонуклеотидов на внутреннюю часть гена провели полное секвенирование клонированной последовательности. Оказалось, что структура выделенной нами последовательности соответствует последовательности гена Г-КСФ, опубликованной ранее, за исключением позиции 546, в которой произошла замена нуклеотида С на Т (рис. 2).

Возможно выделенная нами последовательность является аллельным вариантом гена. Указанная замена расположена в области второго интрона и не может отразиться на экспрессии рекомбинантного гена. Нами получены два варианта генноинженерной конструкции, различающиеся по протяженности 3'-фланкирующей области гена $\alpha s1$ -казеина быка. В первом варианте конструкции размер этого фрагмента равен 1,3 т.п.н., а во втором 1,1 т.п.н. Далее с помощью рестрикционного анализа выделенной плазмидной ДНК, используя рестриктазы BstEII и NcoI, были выделены клоны, в которых встроившийся ген Г-КСФ присутствовал в правильной ориентации и был нужного размера. Затем из этого клона была выделена плазмидная рекомбинантная ДНК и проведен ее рестрикционный анализ с использованием, наряду с вышеуказанными ферментами, еще SpeI, SalI, EcoRI и PstI. На основании такого анализа была построена рестриктная карта рекомбинантной плазмиды

```
atggctg gacctgccac ccagagcccc atgaagctga tgggtgagtg tcttgccca
ggatgggaga gccgctgcc ctggcatggg agggaggctg gtgtgacaga ggggctgggg
```

atccccgttc tgggaatggg gattaaaggc acccagtgtc cccgagaggg cctcaggtgg
tagggaacag catgtctcct gagcccgctc tgtcccagc cctgcagctg ctgctgtggc
acagtgcact ctggacagtg caggaagcca cccccctggg ccctgccagc tccttcccc
agagcttctct gctcaagtgc ttagagcaag tgaggaagat ccagggcgat ggcgcagcgc
tccaggagaa gctggtgagt gaggtgggtg agagggctgt ggaggggaagc ccggtgggga
gagctaaggg ggatggaact gcagggccaa catcctctgg aaggacatg ggagaatatt
aggagcagtg gagctgggga aggctgggaa gggacttggg gaggaggacc ttggtgggga
cagtgttgg gagggctggc tgggatggga gtggaggcat cacattcagg agaaaggca
agggcccctg tgagtcaga gagtgggggt gcagggcaga gaggaactga acagcctggc
aggacatgga gggaggggaa agaccagaga gtcggggagg acccgggaag agcggcgac
ccggccacgg cgagtctcac tcagcatcct tcatcccca gtgtgccacc tacaactgt
gccacccga ggagctggtg ctgctcggac actctctggg catcccctgg gctcccctga
gcagctgcc cagccaggcc ctgcagctgg tgagtgtcag gaaaggataa ggtaatgag
gagggggaag gagaggagga acacccatgg gctccccat gctccagggt tcaagctgg
ggcctgacg tatctcaggc agcacccct aactcttccg ctctgtctca caggcaggt
gcttgagcca actccatagc ggcctttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag
ggatctccc cgagttgggt cccacctgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg
ccaccacat ctggcagcag gtgagccttg ttggcaggg tggccaaggt cgtgctggca
ttctgggac cacagccggg cctgtgtatg ggcctgtcc atgtgtcag cccccagat
ttctcattt gtaataacgc cactcagaa gggcccaacc actgatcaca gtttcccc
acagatggaa gaactgggaa tggcccctgc cctgcagccc acccaggtg ccatgccggc
cttcgctct gcttccagc gccgggcagg aggggtcctg gttgcctccc atctgcagag
cttctggag gtgtctacc gcgttctac ccacctgcc cagccctga

Рис. 2. Нуклеотидная последовательности клонированного гена гранулоцит колонии стимулирующего фактора человека, включающая иницирующий atg и терминирующий tga кодоны, T - локализация нуклеотидной замены C/T, обнаруженной при секвенировании.

pGSm (рис. 3). Как следует из рестрикционного анализа, рекомбинантная плаزمида содержит основные компоненты созданной генноинженерной конструкции: 5'-промоторную область гена α s1-казеина быка; структурную часть гена Г-КСФ человека и 3'- фланкирующую область гена α s1-казеина быка длиной 1300 п.н., включающую в себя участок для правильного полиаденилирования. Полученная генная конструкция может быть использована при получении трансгенных сельскохозяйственных животных – суперпродуцентов биологически активного Г-КСФ человека.

Первичный скрининг опытных животных на наличие трансгена проводят, как правило, методом ПЦР-амплификации. При идентификации животных, трансгенных по гену Г-КСФ человека, могут быть использованы праймеры синтезированные ранее для секвенирования этого гена. Праймеры представлены олигонуклеотидами следующей структуры:

GC3 - aga atg cca gca cga cct
GC4 - agg tgg tag gga aca gca t

GC5 - agt ctc act cag cat cct

GC7 - act ctc tga tct cac ag

Использование представленных праймеров позволило амплифицировать фрагменты ДНК различной длины. При применении праймеров GC4 и GC7 амплифицируется фрагмент гена размером 440 п.н. Для других пар праймеров различным сочетаниям праймеров соответствуют следующие фрагменты: GC4/GC3 – 1000 п.н., GC5/GC3 – 550 п.н., GC5/GC2 – 800 п.н., GC1/GC7 – 620 п.н. При использовании праймеров GC1 и GC2 можно амплифицировать полную копию гена Г-КСФ.

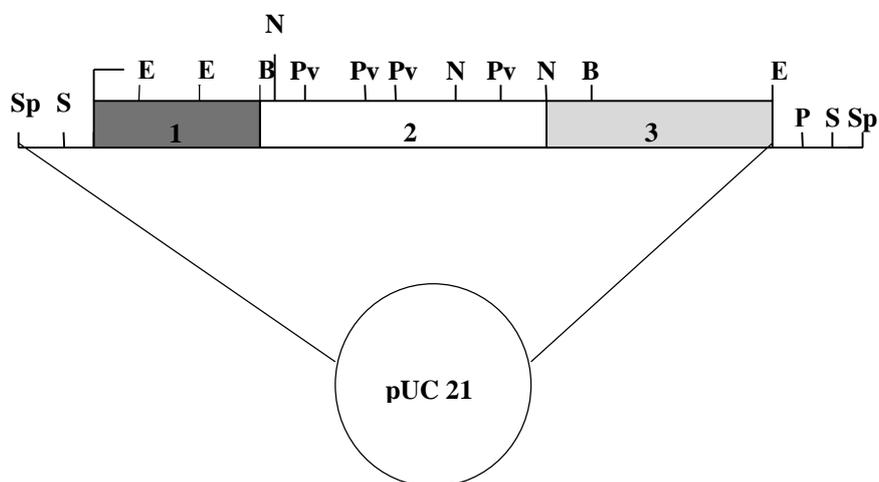


Рис.3. Структура генноинженерной конструкции, несущей ген GCSF

Условные обозначения:

1.  - промоторная область гена α -S₁ казеина быка
2.  - последовательность гена GCSF человека
3.  - 3'- последовательность гена α -S₁ казеина быка

Буквами обозначены сайты рестрикции:

p - Spe I, S - Sal I, E - Eco R I, P - Pst I, B - Bst E II, N - Nco I, Pv - Pvu II

В связи с тем, что рекомбинантная генная конструкция pGCM содержит в своем составе ген Г-КСФ человека и регуляторные районы гена α s1-казеина быка, проводили подбор праймеров, позволяющих амплифицировать различные участки рекомбинантной ДНК. Целесообразность такого подхода объясняется тем, что возможность использования тех или иных праймеров находится в зависимости от вида жи-

вотного, на котором проводят эксперименты. Удачно используемые праймеры для обнаружения трансгенных мышей могут не подходить при анализе трансгенных кроликов.

Как следует из электрофоретического анализа амплифицированной ДНК, при оптимизации условий амплификации с использованием различных праймеров на ген Г-КСФ для обнаружения трансгенных мышей, подходят следующие пары праймеров: GC1/GC7, GC5/GC7, GC4/GC3 и GC5/GC3. Для идентификации трансгенных кроликов можно использовать из указанных только пары GC1/GC7 и GC5/GC3. При использовании пары праймеров GC5/GC2 как в случае мышей, так и кроликов обнаружение трансгенных животных невозможно, в виду неспецифической амплификации.

В результате проведения амплификационного анализа опытных животных, полученных в экспериментах по микроинъекции в зиготы конструкций с геном Г-КСФ человека, идентифицированы две мыши, дающие положительный ответ при тестировании. Повторное проведение анализа опытных проб подтвердило наличие трансгена в тканях этих животных.

Заключение

Получение и клонирование гена Г-КСФ человека провели методом ПЦР-амплификации с использованием синтетических олигонуклеотидов. Выделенный фрагмент ДНК включает стартовый и терминирующий кодон гена. Амплифицированный фрагмент был встроен в полученную нами ранее векторную кассету, содержащую необходимые регуляторные последовательности для тканеспецифической экспрессии трансгена в клетках молочной железы животного. Сконструированная плазида была использована в экспериментах по получению трансгенных мышей. Проведение скрининга опытных животных на наличие рекомбинантного гена Г-КСФ человека позволило идентифицировать двух мышей, содержащих интегрированную генную конструкцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Birnboim N.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., 1979, 7: 1513-1523.
2. Butler S.P., van Cott K., Subramanian A. et al. Current progress in the production of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic animals. Thromb Haemost., 1997, 78: 537-542.
3. Denman J., Hayes M., O'Day C. et al. Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Purification and characterization of the recombinant enzyme. Bio/Technol., 1991, 9: 839-843.

4. Doppler W., Groner B., Ball R.K. Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat α -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line. PNAS, 1989, 86: 104-108.
5. Kushner S.R. An improved method for transformation of E.coli with ColE1-derived plasmids. Genetic engineering.- Amsterdam ets: Elsevier., 1978:17-23.
6. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
7. Uusi-Oukari M., Hyttinen J.M., Korhonen V.P. et al. Bovine alpha s1-casein gene stimulating factor in the milk of transgenic mice. Transgenic Res., 1997, 6, 1: 75-84.
8. Van Cott K.E., Williams B., Velander W.H. et al. Affinity purification of biologically active and inactive forms of recombinant human protein C produced in porcine mammary gland. J Mol Recognt., 1996, 9: 407-414.
9. Wall R.J., Rexroad C.E., Powell A. et al. Synthesis and secretion of the mouse whey acidic protein in transgenic sheep. Transgenic Res., 1996, 5: 67-72.
10. Wright G., Carver A., Cottom D. et al. High level expression of active human alpha-1antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Bio/Technol., 1991, 9: 830-834.

АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ПОТОМСТВА СВИНЕЙ ИЗ ЗИГОТ, МИКРОИНЪЕЦИРОВАННЫХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ

В.П. Рябых, Т.П. Трубицина, Е.Г. Сапунова, Н.С. Ниязов, Л.И. Маркина
Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

С целью совершенствования технологии получения трансгенных свиней были проведены исследования по изучению факторов, влияющих на эффективность получения потомства свиней из зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями.

В результате проведенных исследований выявлены причины низкого выхода эмбрионов на стадии зиготы при вызывании суперовуляции у свиней и разработан оригинальный способ вызывания синхронизированной суперовуляции у свиней-доноров, позволяющий получать до 95% зигот от общего количества извлеченных эмбрионов. Показано, что нативная СЖК может быть использована для вызывания суперовуляции у свиней без снижения эффективности и без признаков анафилаксии.

Изучение факторов, влияющих на супоросность свиней-реципиентов и приживляемость эмбрионов, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями показало, что при трансплантации микроинъецированных зигот синхронность половых циклов реципиента и донора 0 или -1 день не оказывают существенного влияния на

супоросность реципиентов, тогда как при пересадке 2-клеточных эмбрионов синхронность -1 день снижает процент супоросности. Установлено, что свиньи со спонтанной охотой могут быть использованы в качестве реципиентов для трансплантации им микроинъекцированных зигот, однако при неблагоприятных условиях кормления использовать свиней со спонтанной охотой в качестве реципиентов нецелесообразно. Показано, что с увеличением числа эмбрионов, трансплантированных реципиенту, увеличивается число супоросных реципиентов, но снижается приживляемость эмбрионов у этих животных.

Ключевые слова: свинья, зигота, микроинъекция, генно-инженерная конструкция, приживляемость эмбрионов, супероуляция.

Введение

После того как в 1982 г. (11) были получены трансгенные мыши, обладавшие более интенсивным ростом, по сравнению с их однопородными собратьями, были предприняты попытки воспроизвести на сельскохозяйственных животных результаты, полученные на мышах.

Наибольшее число работ по получению трансгенных животных с повышенной продуктивностью и улучшенными качествами продукции было проведено на свиньях (4, 8, 13). Столь большое внимание к свинье, как объекту для работ по трансгенезу, объясняется тем, что свинья является многоплодным животным, имеющим сравнительно короткий воспроизводительный цикл. От нее можно получать большое число оплодотворенных яйцеклеток, необходимых для введения чужеродных генов, и получать от одного реципиента несколько потомков, развившихся их зигот, микроинъекцированных этими генами, что является важнейшим условием для работ по трансгенезу. За эти качества свинью нередко называют «сельскохозяйственной мышью».

В связи с тем, что свиноводство является одной из ведущих отраслей сельскохозяйственного производства, улучшение генотипа свиней и ускорение селекционного процесса в направлении повышения продуктивности, устойчивости к болезням и улучшения качества продукции с помощью трансгенеза имеет большое народнохозяйственное значение. Кроме того, расчеты показывают, что благодаря своей многоплодности и скороплодности свинья может быть удобным объектом для получения трансгенных животных-суперпродуцентов человеческих биологически активных веществ фармакологического назначения.

В последние годы интенсивно ведутся исследования, направленные на выяснение возможности трансплантации органов и тканей животных человеку (ксенотрансплантация). Первоначально казалось, что для целей ксенотрансплантации в большей степени подходят человекообразные обезьяны, однако ограниченное число особей этих видов, обусловленное малоплодием и длительным воспроизводительным цик-

лом, а также сходство большинства инфекционных заболеваний обезьян и человека, от которых сложно полностью обезопасить реципиента, не считая этической стороны вопроса, заставили искать в качестве доноров органов для человека другие виды животных. Принимая во внимание анатомо-физиологические сходства и соразмерность некоторых органов свиньи (сердце, почки и др.) с органами человека, исследователи склонны считать, что при определенном генетическом вмешательстве в иммунные процессы, органы трансгенных свиней могут быть использованы для ксенотрансплантации их человеку. И снова благодаря многоплодности, скороплодности и многочисленности свиная становится одним из основных объектов технологии трансгеноза.

До настоящего времени основным способом введения чужеродных генов в геном животных является метод микроинъекции генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот. В связи с этим технология получения трансгенных животных, основанная на микроинъекционном методе, включает в себя этапы двух видов: генно-инженерные и эмбриологические.

К генно-инженерным этапам относятся: получение нуклеотидных последовательностей структурного гена, кодирующего тот или иной признак; получение нуклеотидных последовательностей регуляторных участков гена (промоторов, энхансеров, и др.); создание генно-инженерных конструкций и анализ интеграции трансгена у животных, полученных из зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями.

Эмбриологические этапы включают: вызывание высокосинхронизированной суперовуляции у животных-доноров с целью получения большого числа эмбрионов на стадии зиготы; хирургическое получение зигот из яйцеводов; визуализацию пронуклеусов в зиготах; микроинъекцию генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот; кратковременное культивирование микроинъецированных эмбрионов *in vitro* и трансплантацию инъецированных эмбрионов синхронизированным животным-реципиентам.

Необходимым условием для получения трансгенных животных является четкое выполнение всех этапов этой многоэтапной технологии. Недостаточно успешное проведение только одного-единственного этапа технологии значительно уменьшает или полностью сводит к нулю положительный результат работы. Несмотря на то, что первые трансгенные свиньи получены в 1985 году, общая эффективность технологии получения трансгенных свиней до сих пор остается очень низкой (0,4-0,6%). Для повышения эффективности технологии необходимо совершенствование как генно-инженерных, так и эмбриологических этапов.

В связи с тем, что свинья является многоплодным животным, большинство эмбриологических этапов, составляющих классическую

технологии трансплантации эмбрионов поздних стадий развития у свиней, разработаны значительно слабее, чем у других видов сельскохозяйственных животных. Еще слабее разработаны эти этапы применительно к технологии получения трансгенных свиней, в которой все работы проводятся на эмбрионах, находящихся на стадии зиготы, подвергающихся различным микроманипуляциям вне организма животного (центрифугирование, прокол цитоплазматической и ядерной оболочек, введение в пронуклеус чужеродной ДНК в буферном растворе и т.д.), действие которых оказывает определенное отрицательное влияние на микроинъектированные зиготы и соответственно затормаживает интенсивность их развития. Поэтому анализ факторов, влияющих на жизнеспособность эмбрионов на разных этапах технологии получения трансгенных свиней и совершенствования основных эмбриологических этапов, может значительно повысить эффективность технологии получения трансгенных свиней.

Материал и методы

Эксперименты были проведены в условиях вивария ВНИИФБиП на свиньях пород ландрас и крупная белая и в условиях свиноводческого комплекса ОПХ ВИЖ «Кленово-Чегодаево», совместно с сотрудниками отдела биотехнологии ВНИИ животноводства на половозрелых свиньях крупной белой породы. У половозрелых свиней за месяц до начала опытов выявляли охоту с целью определения сроков вызывания суперовуляции. Суперовуляцию у большей части свиней вызывали по методу, разработанному в лаборатории клеточной инженерии ВНИИФБиП (1).

Группе свиней, находившихся на 12-15-м дне полового цикла (считая первый день предыдущей охоты нулевым днем) в один и тот же день дважды с интервалом 8-10 часов подкожно вводили один из препаратов простагландина F₂α (эстрофан, анипрост и т.п.) в дозе, рекомендованной для свиней согласно инструкции. Через 24-36 часов после введения простагландина свиньям однократно внутримышечно вводили один из препаратов сыворотки крови жеребых кобыл (СЖК) в дозе 1200-1500 И.Е. на голову, а через 72-80 часов после введения гонадотропина СЖК животным однократно внутримышечно вводили хорионический гонадотропин человека (ХГ) в дозе 750-1000 И.Е. Через 40-42 часа после введения свиньям ХГ их осеменяли однократно и через 16-18 часов после этого проводили извлечение эмбрионов.

Эмбрионы ранних стадий развития извлекали путем промывания яйцеводов у животных-доноров средой Дюльбекко (Юрьевецбиопрепарат, Россия), обогащенной 4% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Flow, Англия).

Морфологическую оценку эмбрионов свиней проводили под инвертированным микроскопом, оснащенным оптикой Номарского, в среде DMEM с NEPEs (Sigma, США), обогащенной 20% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Для облегчения визуализации пронуклеусов в зиготах и ядер в 2-4-клеточных эмбрионах проводили их центрифугирование при 10000-13000g в течение 5-7 минут, обеспечивающее смещение липидных и пигментных включений к одному из полюсов эмбриона.

Микроинъекцию генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот осуществляли стеклянной инъекционной иглой с наружным диаметром кончика 1,5-2 мкм на установке, включающей инвертированный микроскоп с оптикой дифференциально-интерференционного контраста типа ICM-405 (Orton, Германия) и комплект манипуляторов и инжекторов. Точность введения раствора экзогенной ДНК определяли по увеличению размера пронуклеусов. Для микроинъекции использовали генно-инженерную конструкцию, включающую нуклеотидные последовательности человеческого гена инсулиноподобного фактора роста под МТ-промотором (МТ-IGF). Объем чужеродной ДНК, вводимой в пронуклеусы, составлял 1-2 пл с концентрацией 4-6 нг/мкл, что соответствовало 400-600 копиям генно-инженерной конструкции на одну инъекцию.

Трансплантацию микроинжецированных эмбрионов свиньям-реципиентам проводили в ампулярную часть яйцевода со стороны бахромки с помощью специального пластикового катетера.

Результаты и обсуждение

Анализ факторов, лимитирующих получение зигот у свиней-доноров и разработка способа вызывания высокосинхронизированной суперовуляции. В настоящее время получение трансгенных животных осуществляется, главным образом, путем микроинъекции генно-инженерных конструкций в эмбрионы ранних стадий развития. Основным условием, необходимым для передачи трансгена от первичного трансгенного животного его потомкам, является интеграция его в клетки зародышевого пути (гоноциты), из которых в дальнейшем развиваются органы воспроизводительной системы, продуцирующие яйцеклетки или сперматозоиды. Но это условие может быть достигнуто только в том случае, если эмбрионы, предназначенные для введения в них чужеродных генов, будут находиться на стадии зиготы, т.е. на стадии двух пронуклеусов до момента их слияния. Только в этом случае при введении генно-инженерных конструкций в один из пронуклеусов зиготы наиболее высока вероятность того, что чужеродный ген попадет во все клетки будущего организма и, в том числе, в гоноциты. При введении генных конструкций в ядра 2-х или 4-клеточных эмбрионов зна-

чительно снижается вероятность попадания чужеродного гена во все клетки будущего организма, в том числе и в гоноциты. В результате этого чаще всего получают первичные трансгенные животные с мозаичной интеграцией трансгена, который может не передаваться по наследству.

Кроме того, в связи с тем, что частота интеграции трансгена в геном хозяина в работах по трансгенезу остается очень низкой (общая эффективность 0,5%), то для получения одного трансгенного животного требуется большое количество эмбрионов на стадии зиготы.

Исходя из вышеизложенного становится понятным, что для повышения эффективности технологии получения трансгенных свиней за счет снижения числа используемых животных-доноров, затрат труда и средств на их содержание, необходим высокоэффективный способ вызывания суперовуляции у свиней – доноров, позволяющий получать большое число эмбрионов на стадии зиготы. До последнего времени в работах по трансгенезу наибольшее распространение получили два способа вызывания суперовуляции у свиней: классический – характеризующийся введением половозрелым животным на 16-й день полового цикла препаратов, обладающих фолликулостимулирующей активностью и способ, характеризующийся введением аналогичных препаратов в любой день неполовозрелым свинкам, не проявившим ни разу признаков охоты.

На начальном этапе работ нами был проведен эксперимент по изучению эффективности этих способов вызывания суперовуляции у свиней. Эксперимент был проведен на виварии ВНИИФБиП на трех группах свиней. Первая и вторая группы были представлены половозрелыми нормально циклирующими свиными. Свиные 1-й группы служили контролем и не подвергались гормональным обработкам с целью вызывания суперовуляции. Свиные 2-й группы обрабатывали гормональными препаратами по схеме классического способа (9).

На 16-й день полового цикла им однократно подкожно или внутримышечно вводили по 1200-1500 И.Е. ГСЖК, а через 72-80 часов после введения ГСЖК вводили внутримышечно 750-100 И.Е. ХГ на голову. По мере прихода свиней в охоту их дважды покрывали хряком, стараясь провести первое осеменение через 24 часа после введения ХГ, а второе – через 12 часов после первого. Через 18-24 часа после второго осеменения проводили извлечение эмбрионов хирургическим способом. Третья группа состояла из неполовозрелых свинок с живой массой 80-85 кг, у которых еще ни разу не было отмечено признаков охоты. В любой удобный день животным этой группы внутримышечно вводили по 1000-1200 И.Е. ГСЖК на голову и через 70-72 часа после этого внутримышечно вводили 750 И.Е. ХГ. Время осеменения и извлечения эмбрионов были такими же, как и у животных 2-й группы. Анализ результатов этого исследования показал (табл. 1), что выход эмбрионов

на стадии зиготы во всех группах был практически одинаковым (47,0; 49,0 и 52,0%) и составлял только половину от общего числа полученных эмбрионов. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями (3, 4, 8,14), которым также не удалось получить более 50% зигот при вызывании суперовуляции у свиной-доноров с помощью различных гормональных обработок.

Такой невысокий выход зигот у свиной-доноров обусловлен растянутостью процесса овуляции созревших фолликулов, который имеет продолжительность до 6-8 часов, а продолжительность стадии зиготы колеблется в пределах 8-10 часов. Способ вызывания суперовуляции у препубертатных свинок (3 гр.) имеет, на первый взгляд, определенные преимущества. У неполовозрелых свиной не нужно определять половую охоту, поэтому гормональную обработку можно начинать в любой удобный день и сформировать группу из любого числа имеющихся животных.

Таблица 1. Эффективность получения зигот от разных групп свиной-доноров

№ п/п	Группы доноров	Число доноров	Получено эмбрионов				
			всего	на 1-го донора	зигот	2-4-клеточных	% зигот
1	Циклирующие без суперовуляции	10	112	11,2±2,3	55	57	49,0
2	Циклирующие с вызванной суперовуляцией	39	710	18,2±2,8	334	376	47,0
3	Препубертатные с вызванной суперовуляцией	6	117	19,5±3,1	61	56	52,0

Однако основным условием применения данного способа является то, что свинки, предназначенные для получения эмбрионов, не должны до момента гормональной обработки проявлять признаков половой охоты и в их яичниках не должно происходить овуляции фолликулов и образования желтых тел. Однако выдерживать это условие на крупных свиноводческих фермах очень сложно, т.к. чаще всего из-за неудовлетворительного кормления молодых свинок, проявление охоты у них начинается в более позднем возрасте, но при живой массе 60-65 кг, а уловить момент начала циклического проявления охоты у таких свиной практически невозможно. Кроме того, даже в наиболее удачных случаях вызывания суперовуляции у неполовозрелых свинок выход эмбрионов на стадии зиготы составляет в среднем 46-48% от числа полученных эмбрионов (5, 14).

В связи с этим чаще всего при получении трансгенных свиней в качестве доноров эмбрионов вынуждены использовать половозрелых свиней с выявленным половым циклом.

Однако при данном способе вызывания суперовуляции у свиней выход эмбрионов на стадии зиготы составляет только 40-46% от общего числа полученных эмбрионов и обусловлено это тем, что при одинаковой продолжительности фолликулярной фазы, т.е. времени от начала роста фолликулов до их овуляции (в среднем 5 дней), продолжительность половых циклов и у каждой отдельной свиньи может колебаться от 17 до 25 дней. В результате этого 16-й день полового цикла, взятый за исходную точку начала обработки свиней гонадотропными препаратами, может приходиться как на конец или середину фолликулярной фазы полового цикла (при коротких 17-18-дневных циклах), так и на середину лютеальной фазы (при продолжительных 23-25-дневных циклах). У свиней с укороченным естественным половым циклом (17-18 дней) введение ГСЖК на 16-й день придется на конец фолликулярной фазы и животные, независимо от этого введения, через 1-2 дня придут в охоту, т.е. введение ГСЖК окажется бесполезным для фолликулов, которые начали расти под воздействием эндогенного ФСГ за 3-4 дня до введения экзогенного ГСЖК, т.к. для развития фолликула от момента его активного роста до овуляции необходимо 4-5 дней. Кроме того, это введение ГСЖК может оказать и вредное влияние на оплодотворение и развитие яйцеклеток, овулировавших из фолликулов первой волны, потому что введенный на 16-й день ГСЖК у свиней с укороченным половым циклом (17-18 дней) вызовет рост популяции тех антральных фолликулов, которые не пошли в рост под действием эндогенного ФСГ из-за своего малого размера, но под влиянием высоких доз экзогенной фолликулостимулирующей активности ГСЖК начнут расти в виде второй волны, выделяя большое количество половых стероидных гормонов, которые будут отрицательно влиять на оплодотворение и дальнейшее развитие яйцеклеток, овулировавших из первой волны фолликулов. У свиней с удлиненным половым циклом (23-25 дней) введение ГСЖК на 16-й день цикла придется на лютеальную фазу, когда рост фолликулов подавлен действием прогестерона, выделяемого активно функционирующими желтыми телами, и поэтому животные этой группы придут в охоту позднее ожидаемых сроков, нарушая всякую синхронизацию половых циклов.

В результате этого в обоих вышеприведенных случаях введение экзогенных гонадотропинов приходится на период времени, когда состояние яичников является неблагоприятным для развития многочисленной однородной популяции антральных фолликулов и получения в дальнейшем большого числа эмбрионов на стадии зиготы. И только у свиней с продолжительностью естественного полового цикла в 20-21 день обработка гонадотропинами на 16-й день цикла приходится на

начало фолликулярной фазы цикла, т.е. на самый благоприятный период для роста фолликулов. При этом одним из неприятных моментов является и то, что продолжительность половых циклов у одной и той же свиньи сильно варьирует и поэтому невозможно определить продолжительность следующего цикла по продолжительности предыдущего, т.к. чаще всего они не совпадают по продолжительности. Все это не позволяет четко синхронизировать половые циклы свиной с различной продолжительностью, а, следовательно, и получить большое число эмбрионов на стадии зиготы при использовании способа вызывания суперовуляции у половозрелых свиной, начинающегося на 16-й день полового цикла. Кроме того, и сам процесс овуляции растянут во времени.

Исходя из вышеизложенного нами была предпринята попытка разработать способ вызывания суперовуляции у свиной, который позволил бы получать от животных-доноров больший процент эмбрионов на стадии зиготы.

Предпосылкой для разработки нового способа вызывания суперовуляции у свиной послужили три предварительно установленных факта:

а) на фоне активно функционирующих желтых тел в яичниках свиной не происходит роста антральных фолликулов до предовуляторного состояния ;

б) у свиной в отличие от коров, коз и овец желтые тела чувствительны к действию простагландина $F_2\alpha$ очень короткий период времени (с 12 по 16-й день в зависимости от продолжительности полового цикла);

в) продолжительность половых циклов у свиной может колебаться от 17 до 25-ти дней.

Основываясь на этих фактах нами было сделано предположение, что введение свиным препарата простагландина $F_2\alpha$ на 12-14-й день полового цикла вызовет у них начало регрессии желтого тела и, таким образом, приведет яичники всех обработанных свиной, независимо от продолжительности их естественных половых циклов, к состоянию начала фолликулярной фазы цикла, т.е. к состоянию наиболее благоприятному для воздействия на них экзогенными гонадотропинами, что приведет к развитию в яичниках многочисленной однородной популяции антральных фолликулов и получению большого числа эмбрионов на стадии зиготы.

Экспериментальная проверка этого предположения была проведена на половозрелых свиных в виварии института и в условиях свиноводческого комплекса ОПХ «Кленово-Чегодаево». В этих экспериментах у животных 1-й группы суперовуляцию вызывали по общепринятому способу путем введения препарата ГСЖК на 16-й день полового цикла, а у животных 2-й группы – по вновь предложенному способу.

Сравнительный анализ эффективности вновь предложенного и известного способов показал (табл. 2), что выход эмбрионов на стадии зиготы был выше у свиней 2-й группы почти в 2 раза (13,3 против 6,8) по сравнению с 1-й группой и составил 67,2% от общего числа полученных эмбрионов, против 42,2% в контрольной группе.

Таблица 2. Эффективность получения зигот от свиней-доноров при разных способах вызывания суперовуляции (опыт в условиях вивария института)

№ группы	Число свиней	Количество эмбрионов на одного донора						
		зиготы		2 -клеточные		4 -клеточные		всего
		п	%	п	%	п	%	п
1	17	6,8±4,7	42,2	6,1±6,7	37,9	3,2±3,8	19,9	16,1±5,1
2	15	13,3±8,8	67,2	4,4±3,6	22,2	2,1±1,4	10,6	19,8±8,1

Увеличение выхода зигот у животных опытной группы происходило за счет снижения выхода 2-клеточных (22,2 против 37,9%) и 4-клеточных эмбрионов (10,6 против 19,9%). При этом общее число эмбрионов, полученных от животных 2-й группы, было несколько выше по сравнению с контрольной группой (19,8 против 16,1).

Анализ результатов эксперимента, проведенного на свиноводческом комплексе свидетельствует о том (табл. 3), что выход эмбрионов на стадии зиготы был выше у свиней 2-й группы почти в 3 раза (14,0 против 4,7) по сравнению с 1-й группой и составил 87,5% от общего числа полученных эмбрионов, против 31,1% в контрольной группе. При этом общее число эмбрионов, полученных на одного донора, в обеих группах было практически одинаковым (15 и 16).

Таблица 3. Эффективность получения зигот от свиной – доноров при разных способах вызывания суперовуляции (опыт на свиноводческом комплексе)

№ группы	Число свиной	Количество эмбрионов на одного донора						
		зиготы		2-клеточные		4 -клеточные		всего
		п	%	п	%	п	%	п
1 (контр.)	12	4,7±4,5	31,3	9,0±7,0	60	1,3±1,7	9,7	15
2 (опытн)	27	14,0±5,2	87,5	2,0±0,8	12,5	0	0	16

Таким образом, в этом эксперименте предлагаемый способ вызывания синхронизированной суперовуляции у половозрелых свиной позволил увеличить выход эмбрионов на стадии зиготы почти в 3 раза по сравнению с известным способом и довести его до 87,5%.

Более высокий выход эмбрионов на стадии зиготы, полученный в опытах на свиноводческом комплексе, по сравнению с опытами на виварии, объясняется тем, что на комплексе были использованы молодые ремонтные свинки, а на виварии значительную часть подопытных животных составляли свиньи, поросившиеся по 2-3 раза и имевшие живую массу свыше 150 кг. В связи с этим доза простагландина F_{2α}, используемая для вызывания синхронизации половых циклов этих свиной, по-видимому, оказалась недостаточной для быстрой регрессии всех желтых тел. Дальнейшие наши исследования, проведенные на комплексе, показали (табл. 4), что выход зигот при вызывании суперовуляции по вновь предложенному способу колебался от 85 до 95% от общего количества извлеченных эмбрионов. В связи с тем, что во всех последующих работах по трансгенезу мы пользовались для вызывания суперовуляции у свиной только вновь предложенным способом, то описание его изложено в разделе «Материал и методы».

Таблица 4. Вызывание суперовуляции у свиней –доноров различными препаратами СЖК

№ п/п	Показатели	ГСЖК		Нативная СЖК	
		n	%	n	%
1	Обработано свиней-доноров	24	100,0	38	100,0
2	Число свиней, прореагировавших на гормональную обработку	20	83,3	38	100,0
3	Получено эмбрионов (всего)	368	100,0	690	100,0
	– зигот	334	90,8	660	95,7
	– 2-клеточных	34	9,2	30	4,3
4	Получено зигот на одного донора				
	– из расчета на всех прореагировавших доноров	13,9±2,3		17,4±2,7	
	– из расчета на доноров, давших эмбрионы	18,5±2,9		22,0±3,1	

Использование предлагаемого способа синхронизированной суперовуляции у половозрелых свиней обеспечивает, по сравнению с существующими способами, следующие преимущества:

а) повышение выхода эмбрионов на стадии зиготы у свиней-доноров в 2-3 раза, что особенно важно для снижения затрат и повышения эффективности работ при получении трансгенных свиней;

б) возможность формировать большие группы свиней-доноров для вызывания суперовуляции за счет отбора животных, пришедших в охоту в течение 1-4-х дней, а не в течение только одного единственного дня, как это делается при известном способе, что позволяет проводить работу по трансгенезу в условиях небольших ферм, повышая ее эффективность;

в) проводить однократное осеменение свиней-доноров за счет высокой синхронности прихода их в охоту.

Оригинальность вновь предложенного способа вызывания высокосинхронизированной суперовуляции защищена патентом № 2071352 (1).

Во всем мире для вызывания суперовуляции у свиней используют лиофилизированные препараты очищенной сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК), которые не дают анафилаксии. В связи с тем, что в России препараты ГСЖК не производятся, а импортные препараты имеют высокие цены, в процессе работы возникла необходимость в выяснении вопроса о возможности замены очищенного препарата ГСЖК нативной жидкой СЖК, которую выпускает единственная в нашей стране Орская биофабрика.

Анализ результатов этих исследований (табл. 4) показал, что процент животных-доноров, реагировавших на гормональную обработку, был практически одинаков как при обработке препаратом ГСЖК

(Сергон), так и при обработке нативной СЖК (83,3 против 100%, соответственно). При этом число эмбрионов, полученных на одного донора, прореагировавшего на гормональную обработку, было даже несколько выше при использовании нативной жидкой СЖК, по сравнению с препаратом очищенного ГСЖК (18,1 против 15,3, соответственно). Но этот факт, по-видимому, можно объяснить снижением активности ГСЖК в процессе хранения, тогда как нативная СЖК имела меньший срок хранения. Поэтому при введении животным одной и той же расчетной дозы, фактическая активность ГСЖК могла быть ниже, чем у нативной СЖК.

Самым важным показателем при вызывании суперовуляции у животных-доноров, в работах по трансгенезу, является выход эмбрионов на стадии зиготы. Результаты вызывания суперовуляции у половозрелых свиней-доноров, полученные на основе использования разработанного нами способа вызывания высокосинхронизированной суперовуляции, свидетельствуют о том, что выход зигот в нашем эксперименте был очень высоким как при использовании ГСЖК, так и нативной СЖК и составил 90,8 и 95,7%, соответственно, от общего числа полученных эмбрионов.

При этом, из расчета на всех прореагировавших доноров, выход зигот составил 13,9 и 17,4 на одного донора при использовании ГСЖК и нативной СЖК, соответственно, а при расчете на доноров, давших эмбрионы, этот показатель составил 18,5 и 22,0 зиготы на 1-го донора, соответственно.

Главным недостатком нативного СЖК при использовании ее для вызывания суперовуляции у сельскохозяйственных животных является проявление анафилаксии у определенной части животных, особенно у овец и крупного рогатого скота. В проведенном нами эксперименте из 38 свиней, обработанных большими объемами (до 25 мл) нативной СЖК, не наблюдалось ни одного случая анафилаксии, что свидетельствует об устойчивости свиней к нативной СЖК.

Таким образом, анализ результатов эксперимента по вызыванию суперовуляции у свиней с помощью очищенного препарата ГСЖК и нативной СЖК дает основание заключить, что для вызывания суперовуляции у половозрелых свиней может быть использована более дешевая нативная СЖК без снижения эффективности и без признаков анафилаксии.

Изучение факторов, влияющих на супоросность свиней-реципиентов и приживляемость микроинъекцированных эмбрионов. В связи с тем, что в работах по получению трансгенных свиней исследователям приходится трансплантировать животным-реципиентам эмбрионы самых ранних стадий развития (зиготы и 2-клеточные), которые в свою очередь еще подвергались различным манипуляциям, связанным с введением в них генно-инженерных конструкций, то те прин-

ципы и закономерности, определяющие успех при обычной трансплантации эмбрионов поздних стадий развития (морул и бластоцист), не всегда применимы для трансплантации эмбрионов ранних стадий развития в программах по получению трансгенных животных. Поэтому выяснение зависимости приживляемости микроинъецированных эмбрионов ранних стадий развития от синхронности половых циклов свиной-доноров и реципиентов, а также от числа пересаженных эмбрионов является совершенно новым направлением исследований, возникшим в связи с развитием работ по получению трансгенных животных. Даже при обычной трансплантации эмбрионов поздних стадий развития большинство авторов (7,10, 15) считают допустимым асинхронность половых циклов у свиной-4доноров и реципиентов не более 24 часов. При этом, все эти авторы сходятся во мнении, что наиболее благоприятный вариант при асинхронной пересадке, когда половой цикл животного-донора опережает половой цикл животного реципиента.

Анализ результатов супоросности свиной-реципиентов в зависимости от синхронности половых циклов доноров и реципиентов показал (табл. 5), что наибольший процент супоросности (57,1%) наблюдался при трансплантации эмбрионов ($\approx 80\%$ зигот и 20% двухклеточных), микроинъецированных генно-инженерной конструкцией, свиным-реципиентам, половой цикл которых был синхронным с половым циклом животных-доноров (синхронность 0). Несколько худший результат супоросности (38,5%) был получен при отставании полового цикла реципиента от цикла донора на 1 день (синхронность-1 день). Не было зафиксировано супоросности у свиной-реципиентов, половой цикл которых отставал от полового цикла донора эмбрионов на 2 дня (синхронность-2 дня) или опережал половой цикл донора на 1 день (синхронность+1 день). Аналогичная ситуация наблюдалась и при анализе результатов приживляемости эмбрионов. Она также была несколько выше у свиной-реципиентов, имевших половой цикл, синхронный половому циклу донора (синхронность 0) по сравнению с реципиентами, имевшими синхронность -1 день как в расчете на супоросных реципиентов (30,6 против 25,3%), так и при расчете на всех использованных реципиентов (13,7 против 10,7%).

Таким образом, результаты наших исследований показали, что при трансплантации свиных зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями, необходима строгая синхронизация половых циклов животных-доноров и реципиентов (синхронность 0), но допустима и синхронность -1 день.

К аналогичным выводам пришли и другие исследователи, занимавшиеся разработкой технологии получения трансгенных свиной (13, 14). В исследованиях Шпрингмана и Брема (14), в которых синхронность половых циклов животных-доноров и реципиентов составляла 12 часов, супоросность у свиной-реципиентов составляла в разных экспе-

риментах от 35 до 42%, т.е. несколько ниже, чем в наших экспериментах, что еще раз подтверждает правильность наших выводов.

На первых этапах разработки технологии получения трансгенных свиней, когда в результате вызывания суперовуляции у половозрелых свиней классическим способом получали не только зиготы, но и 2-4-клеточные эмбрионы, были проведены исследования по изучению приживляемости эмбрионов разных стадий развития, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями. Анализ результатов этих экспериментов показал (табл. 6), что процент супоросности был выше у свиней-реципиентов, которым трансплантировали эмбрионы, микроинъецированные на стадии 4-х бластомеров (100%). У свиней-реципиентов, которым трансплантировали преимущественно микроинъецированные зиготы (80-85% зигот и 15-20% двухклеточных эмбрионов) супоросность наступила в 44,1% случаев. И самый низкий процент супоросности (33,3%) был отмечен у реципиентов, которым трансплантировали преимущественно (около 90%) микроинъецированные 2-клеточные эмбрионы.

Аналогичная тенденция наблюдалась и при анализе результатов приживляемости эмбрионов (табл. 6). При расчете на всех реципиентов она также была выше при трансплантации 4-клеточных эмбрионов (27,4%) и самой низкой при пересадке 2-клеточных эмбрионов (6,6%). Однако при пересчете приживляемости эмбрионов только на супоросных реципиентов существенных различий между группами уже не наблюдалось и самой высокой она становилась у реципиентов, которым пересаживали микроинъецированные зиготы (30,0%), а самой низкой (23,6%) все же оставалась у двухклеточных эмбрионов.

Таблица 5. Приживляемость микроинъцированных эмбрионов и супоросность у свиной-реципиентов при разной синхронности половых циклов с донорами эмбрионов

Синхронность циклов (дни)	Число реципиентов	Супоросных реципиентов		Трансплантировано эмбрионов		Получено поросят			Приживляемость эмбрионов	
		n	%	всего	на 1-го реципиента	всего	на всех реципиентов	на 1-го супоросного	на всех реципиентов	на супоросных реципиентов
0	14	8	57,1	314	22,4±3,0	41	2,9±0,9	5,1±0,8	13,7	30,6
-1	16	6	37,5	354	23,2±2,1	37	2,3±0,8	6,1±0,9	10,7	25,3
-2	4	0	0	89	22,2±1,8					
+1	3	0	0	67	22,3±2,1					

Таблица 6. Супоросность свиной-реципиентов и приживляемость эмбрионов, микроинъцированных генно-инженерной конструкцией, в зависимости от стадии развития трансплантированных эмбрионов

Стадия развития эмбрионов	Число реципиентов	Супоросные реципиенты		Пересажено эмбрионов		Получено поросят			Приживляемость эмбрионов	
		n	%	всего	на 1-го реципиента	всего	на всех реципиентов	на 1-го супоросного	на всех реципиентов	на супоросных
зигота	18	8	44,4	412	22,9±2,7	51	2,8±0,8	6,4±0,5	12,1	30,0
2-клеточная	9	3	33,3	205	22,8±2,4	13	1,4±1,8	4,3±1,4	6,6	23,6
4-клеточная	3	3	100	51	17,0±1,0	14	4,7±2,4	4,7±2,4	27,4	27,4

Таблица 7. Супоросность свиной-реципиентов в зависимости от стадии развития трансплантированных эмбрионов и синхронности половой охоты у доноров и реципиентов

Стадия развития эмбрионов	Число реципиентов	Супоросные реципиенты						Прохолостевшие реципиенты					
		всего		синхронность				всего		синхронность			
				0		-1день				0		-1день	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Зигота	18	8	44,4	4	22,2	4	22,2	10	55,6	5	27,8	5	27,8
2-клеточная	9	3	33,3	2	22,2	1	11,1	6	66,6	1	11,1	5	55,5
4-клеточная	3	3	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0

Одним из факторов, который может оказывать свое влияние на приживляемость эмбрионов, по-видимому, является микроинъекция генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот и в ядра 2-4-клеточных эмбрионов. При микроинъекции конструкции в ядра 4-клеточного эмбриона инъекция проводится чаще всего в 2 бластомера, видимых после центрифугирования и смещения липидных включений к одному из полюсов, поэтому неповрежденными остаются 2 полноценных бластомера, которые и обеспечивают высокую приживляемость этих эмбрионов. Кроме того, 4-клеточные эмбрионы, которые прошли два первых деления дробления, в большей степени являются жизнеспособными. При микроинъекции конструкции в ядра 2-клеточных эмбрионов чаще всего прокалывают иглой оба ядра и, по-видимому, эмбрионы травмируются более сильно, что и приводит к низкому проценту супоросности и пониженной приживляемости эмбрионов.

Микроинъекция конструкции в зиготы проводится в один из пронуклеусов, чаще всего в мужской, который значительно крупнее ядра бластомера из 2-клеточного эмбриона и хорошо виден после центрифугирования, поэтому его удобнее инъецировать, нанося меньше повреждений зиготе, что и обуславливает более высокую приживляемость зигот, по сравнению с 2-клеточными эмбрионами.

Вторым фактором, который может оказывать существенное влияние на супоросность реципиентов при трансплантации эмбрионов разных стадий развития, может быть синхронность половых циклов доноров эмбрионов и животных-реципиентов. Анализ результатов вышеприведенного эксперимента с позиций синхронности половых циклов доноров и реципиентов показал (табл. 7), что при трансплантации микроинъецированных зигот супоросными стало одинаковое количество реципиентов при синхронности 0 и -1 день (22,2%). Также одинаковым было и количество прохолостевших реципиентов при синхронности 0 и -1 день (27,8%). Эти результаты свидетельствуют о том, что при трансплантации микроинъецированных зигот допустима синхронность как 0, так и -1 день.

При трансплантации 2-клеточных эмбрионов супоросными стали 22,2% реципиентов с синхронностью 0 и 11,1% – с синхронностью -1 день. Еще более выраженная закономерность была отмечена в этой группе у прохолостевших реципиентов, среди которых 55,5% прохолостели при пересадке с синхронностью -1 день и только 11,1% с синхронностью 0. Этот факт дает основание предположить, что при трансплантации 2-клеточных эмбрионов, микроинъецированных генно-инженерной конструкцией, необходима более точная синхронизация половых циклов доноров и реципиентов (0) и почти не подходит синхронность -1 день. Таким образом, результаты этого эксперимента показали, что при трансплантации свиньям-реципиентам зигот, микроинъецированных генно-инженерной конструкцией, синхронность поло-

вых циклов донора и реципиента 0 или -1 день не оказывают существенного влияния на супоросность реципиентов, тогда как при трансплантации микроинъецированных 2-клеточных эмбрионов синхронность -1 день резко снижает супоросность реципиентов.

Для того, чтобы иметь достаточное количество животных-реципиентов, имеющих половой цикл, синхронный половому циклу животного-донора, в работах по трасгенезу обычно проводят гормональную подготовку этих животных параллельно с животными-донорами. Но при проведении работ на крупных свиноводческих фермах, где имеется большой выбор животных, появляется возможность использовать в качестве реципиентов свиней, проявивших спонтанную охоту в день осеменения животных-доноров. Однако в этой проблеме необходимо учитывать как положительные, так и отрицательные моменты.

При гормональной подготовке животных-реципиентов существует большая вероятность того, что в яичниках этих животных разовьется большее число желтых тел для поддержания супоросности, чем при спонтанной охоте, при которой могут наблюдаться как ановуляторные циклы, так и развитие малого числа желтых тел. В то же время половые циклы у животных-доноров и реципиентов, индуцированные гормональной обработкой, могут значительно отличаться по своей продолжительности и поэтому не быть строго синхронизированными. Тогда как при использовании реципиентов со спонтанной охотой есть возможность более строго соблюсти синхронность половых циклов животных-доноров и реципиентов.

Исходя из вышеизложенного, была предпринята попытка сравнить показатели супоросности и приживляемости эмбрионов у свиней-реципиентов с разными видами половой охоты.

Анализ результатов этих исследований показал (табл. 8), что при использовании в качестве реципиентов свиней со спонтанной охотой супоросность составила 50%, а у свиней-реципиентов с индуцированной охотой – 33%. При этом приживляемость эмбрионов, микроинъецированных генно-инженерной конструкцией, оказалась практически одинаковой как при трансплантации эмбрионов свинкам со спонтанной охотой, так и с индуцированной гормональными препаратами (11,1 и 10,2%, соответственно). Результаты этого эксперимента дали основание заключить, что использование в качестве реципиентов свиней со спонтанной охотой, по крайней мере, не ухудшает показателей супоросности и приживляемости эмбрионов, но значительно снижает затраты труда и гормональных препаратов на подготовку животных – реципиентов.

Однако это утверждение оказалось правомочным только при нормальных условиях кормления и содержания свиней – реципиентов. Дальнейшие исследования (табл. 9) показали, что при неблагоприятных

Таблица 8. Супоросность и приживляемость эмбрионов в зависимости от вида половой охоты у свиной-реципиентов

№ п/п	Показатели	Спонтанная		Индукцированная	
		n	%	n	%
1	Число использованных свиной-реципиентов	12	100,0	30	100,0
2	Число супоросных реципиентов	6	50,0	10	33,3
3	Пересажено эмбрионов:				
	– всего	303		606	
4	– на 1-го реципиента	25,2±2,9		20,2±1,8	
	Получено поросят:				
4	– всего	15		27	
	– на всех реципиентов	1,25±0,6		0,9±0,7	
5	– на одного супоросного реципиента	2,5±0,5		3,0±0,6	
	Приживляемость эмбрионов:				
5	– на всех реципиентов		5,0		4,4
	– на супоросных реципиентов		11,1		10,2

Таблица 9. Супоросность и приживляемость микроинъецированных эмбрионов у свиной- реципиентов со спонтанной охотой при неблагоприятных условиях кормления

№ п/п	Показатели	Количество	
		n	%
1	Использовано реципиентов	15	100,0
2	Супоросных реципиентов	3	20,0
3	Трансплантировано:		
	– всего	332	
4	– на 1-го реципиента	22,1±2,3	
	Получено поросят:		
4	– всего	11	
	– на 1-го реципиента	3,7±0,8	
5	Приживляемость эмбрионов:		
	– на всех реципиентов		3,3
	–на супоросных реципиентов		15,5

условиях кормления свиной-реципиентов у них значительно снижается процент супоросности (до 20%) без снижения приживляемости эмбрионов в расчете на супоросных реципиентов (15,5%). Этот факт свидетельствует о том, что у определенной части свиной, у которых даже при неблагоприятных условиях кормления в яичниках развивается достаточно многочисленная популяция преовуляторных фолликулов и из них образуется большое число нормально функционирующих желтых тел, приживляемость эмбрионов оставалась такой же, как и у животных с охотой, индуцированной гормональными препаратами, но судя по

проценту супоросности число таких реципиентов при недостаточном кормлении было не велико.

Таким образом, результаты этого исследования показали, что при нормальных условиях кормления свиные со спонтанной охотой могут быть использованы в качестве реципиентов для трансплантации им зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями, однако при недостаточном кормлении использование таких свиных в качестве реципиентов нецелесообразно.

В связи с тем, что манипуляции, связанные с микроинъекцией генно-инженерных конструкций в свиные зиготы, вызывают гибель определенной части этих зигот, возникает необходимость в выяснении вопроса о количестве микроинъецированных эмбрионов, которое необходимо пересаживать животному-реципиенту, чтобы создать критическую массу эмбрионов в матке для получения оптимальной супоросности.

Исследования, проведенные при разработке обычной технологии трансплантации, показали, что при пересадке свиных эмбрионов поздних стадий развития (морул и бластоцист), не подвергавшихся манипуляциям, связанным с микроинъекцией генно-инженерных конструкций, целесообразно пересаживать животному реципиенту до 16-18 эмбрионов (7, 10), но не менее 4-х, т.к. меньшее число эмбрионов не достаточно для поддержания функции желтых тел в яичниках реципиентов, а, следовательно, и супоросности (12).

Анализ результатов исследований по выяснению зависимости приживляемости эмбрионов от числа зигот, трансплантированных свиным-реципиентам, показал (табл. 10), что с увеличением числа трансплантированных эмбрионов с 10 до 40 увеличивалось число супоросных реципиентов с 20 до 43%. Также с увеличением числа трансплантированных зигот увеличивалась и величина гнезда на одного супоросного реципиента с 3,0 до 4,7 поросят. При этом прослеживается определенная тенденция, заключающаяся в том, что с увеличением числа трансплантированных эмбрионов приблизительно на 10, величина гнезда на одного супоросного реципиента возрастает с базового уровня – 3-х поросят на 0,5 поросенка (3,0; 3,5; 4,0; 4,7), а 3 плода, по-видимому, являются той критической массой, которая необходима для поддержания супоросности у свиных-реципиентов, что подтверждает мнение Полджа (12) о необходимости трансплантации свиным не менее 4-х эмбрионов. Подобная тенденция была нами отмечена и на кроликах, у которых с увеличением числа трансплантированных зигот также отмечалось повышение процента сукрольных реципиентов (2). Но если с увеличением числа трансплантированных эмбрионов число супоросных реципиентов увеличивается, то приживляемость эмбрионов у них при этом снижается с 33,3% при пересадке 10 эмбрионов до 13,3% – при пересадке 31-40 эмбрионов. Аналогичное снижение при-

живляемости эмбрионов наблюдается и при пересчете на всех использованных реципиентов с 8,9 до 5,7% при пересадке 11-20 и 31-40 микроинъецированных зигот, соответственно. Из других немногочисленных исследований, в которых анализировалась эта проблема, следует отметить работу Шпрингмана К. и Брема Г. (14). В этом исследовании одной группе (1 гр.) свиной-реципиентов трансплантировали менее 40 микроинъецированных эмбрионов, а второй группе – более 40. Супоросными стали 25% реципиентов 1-й группы и 46% – 2-й группы. Однако величина гнезда была выше у супоросных реципиентов 1-й группы, чем 2-й (4,0 против 3,6). Практически такое же количество поросят было получено в наших экспериментах при пересадке от 11 до 30 микроинъецированных зигот на реципиента.

Таблица 10. Приживляемость микроинъецированных эмбрионов и супоросность у свиной-реципиентов в зависимости от числа трансплантированных эмбрионов

№ п/п	Число пересаженных эмбрионов на 1-го реципиента	Число использованных реципиентов	Супоросных реципиентов		Получено поросят		Приживляемость эмбрионов (%)	
			n	%	всего	на 1-го супоросного реципиента	на всех реципиентов	на супоросных реципиентов
1	1-10	5	1	20,0	3	3	6,6	33,3
2	11-20	21	8	38,1	28	3,5	8,9	23,4
3	21-30	32	11	34,4	43	4,0	5,4	15,6
4	31-40	7	3	43,0	14	4,7	5,7	13,3

Более низкий процент приживляемости эмбрионов при трансплантации большого числа микроинъецированных зигот (свыше 30), по-видимому, можно объяснить повышенной смертностью эмбрионов на стадии элонгации в связи с недостатком места в период имплантации, когда на небольшом участке рога матки скапливается большое число элонгированных эмбрионов длиной до 1 метра. Видимо, поэтому наиболее высокая приживляемость эмбрионов наблюдается при трансплантации не очень большого числа микроинъецированных зигот (25). В этом случае после гибели определенной части эмбрионов на ранних стадиях развития, вызванной различными манипуляциями, связанными с микроинъекцией в них генно-инженерных конструкций, стадии элонгации достигает меньшее число эмбрионов, для которых сохраняются лучшие условия для имплантации. Однако при уменьшении числа пересаженных зигот до 10, при общей приживляемости в пределах 5-8%,

этого количества эмбрионов оказывается недостаточным для создания критической массы плодов и поддержания супоросности.

Одним из наиболее информативных и объективных показателей в определении необходимого числа трансплантируемых эмбрионов является процент приживляемости, рассчитанный на всех использованных реципиентов. Анализ данных таблицы 10 по этому показателю свидетельствует о том, что при пересадке одного и того же числа эмбрионов, как в среднем по 25 (21-30) микроинъецированных зигот, так и по 35 (31-40) в конечном итоге получается практически одинаковое количество поросят (5,4 и 5,7% соответственно), а при трансплантации того же числа эмбрионов, но в среднем по 15 эмбрионов (11-20), количество полученных поросят возрастает до 8,9%, т.е. более чем в 1,6 раза.

Таким образом, результаты наших исследований показывают, что при получении потомства свиней из зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями, наибольший эффект достигается при трансплантации животным-реципиентам от 15 до 20 зигот.

Однако в практических условиях вопрос о числе эмбрионов, которое необходимо трансплантировать свинье-реципиенту должен решаться в зависимости от конкретной ситуации. При избыточном количестве эмбрионов и ограниченном числе реципиентов допустимо пересаживать одному реципиенту большое число эмбрионов (40 и выше). В этом случае супоросных реципиентов будет больше, но приживляемость эмбрионов у них будет невысокая. Если же животных-реципиентов имеется в достаточном количестве, то целесообразно трансплантировать одному реципиенту меньше микроинъецированных зигот (15-20), в результате чего супоросных реципиентов будет несколько меньше, чем при пересадке 40 эмбрионов, но приживляемость эмбрионов будет выше и общее количество развившихся поросят также будет выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рябых В.П., Сапунова Е.Г., Буралхиев Б. и др. Способ вызывания синхронизированной суперовуляции у половозрелых свиней. Патент РФ № 2071352. 1997.
2. Рябых В.П., Сапунова Е.Г., Трубицина Т.П., Маркина Л. И. Эффективность получения потомства кроликов из зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями. Сборник научных трудов. Том XXX VIII. ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск. 1999: 3-13.

3. Шихов И.Я., Эрнст Л.К., Некрасов А.А. и др. Получение трансгенных свиней. Генноинженерные сельскохозяйственные животные. Сб. научных трудов. М. 1995.
4. Brem G., Brenig B., Goodman M. et al. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. Zuchthygiene, Berlin, Hamburg. 1985, 20: 251-252.
5. Brem G., Muller M. Large transgenic mammals. Animals with Novel Genes. Worman Maclean ed. Cambridge University Press, 1994: 179-241.
6. Brem G., Springmann K. Gentansfer beim Schwein durch DNA-Mikroinjektion in Zygoten. Tierarztl. Prax. Suppl. 1989, 4: 31-34.
7. Day B.N. Embryo transfer in swine. Theriogenol., 1979, 11: 27-31.
8. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L. Production of transgenic rabbits, sheeps and pigs by microinjection. Nature, London, 1985, 315: 680-683.
9. Hunter R.H.F. Superovulation and fertility in the pig. Anim. Prod., 1964, 6: 189-194.
10. Hunter R.H.F., Polge C., Rowson L.E.A. The recovery transfer and survival of blastocysts in pigs. J. Reprod. Fert., 1966, 14: 501-502.
11. Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature, 1982, 300: 611-615.
12. Polge C., Rowson L.E.A., Chang M.C. The effect of reducing the number of embryos during early stages of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. J. Reprod. Fert., 1966, 12: 395-397.
13. Pursel V.G., Miller K.F., Pinkert C.A. et al. Effect of ovum cleavage stage at microinjection on embryonic survival and gene integration in pig. 11th Int. Congr. on Anim. Reprod. 26-30/06. 1988. Dublin.
14. Springmann K., Brem G. Embryotransfer beim Schwein in Rahmen von Gentransferprogrammen. Tierarztl. Prax. Suppl., 1989, 4: 21-25.
15. Webel S.K., Peters J.B., Anderson L.L. Synchronous and asynchronous transfer of embryos in the pig. J. Anim. Sci., 1970, 30: 565-568.

АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ ЧАСТОТЫ ИНТЕГРАЦИИ ТРАНСГЕНА ОТ СТАДИИ РАЗВИТИЯ ЗИГОТ У МЫШЕЙ

В.П. Рябых, Е.А. Попова, Г.А. Дворянчиков, Л.Б. Иванова
Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

С целью совершенствования технологии получения трансгенных животных были проведены исследования по выяснению возможной зависимости между частотой интеграции генно-инженерной конструкции и фазой клеточного цикла зиготы, на которой эта конструкция

инъецировалась в пронуклеусы. Эксперимент проведен на гибридных мышцах (F1) с точно установленным временем осеменения. Зиготы извлекали и микроинъецировали через разные промежутки времени после обнаружения копуляционных пробок: 5,5-7,0 ч (1 гр.); 7,5-8,5 ч (2 гр.), 9,0-11,5 ч (3 гр.) и 12,0-15,0 ч. (4 гр.). Для микроинъекции использовали генно-инженерную конструкцию, включающую нуклеотидные последовательности гена человеческого гранулоцит-колониестимулирующего фактора под промотором αS_1 казеина (αS_1 -Cn-G-CSF). В первой серии опытов микроинъецированные зиготы культивировали *in vitro* до стадии бластоцисты и затем проводили анализ интеграции трансгена в эмбрионы. Для исключения ложноположительных результатов и определения истинной интеграции конструкции на стадии бластоцисты использовали рестриктазу DpnI. Во второй серии опытов микроинъецированные зиготы трансплантировали ложнобеременным реципиентам. Определение интеграции генно-инженерной конструкции в геном эмбрионов, проведенное методом ПЦР, показало, что наибольшая частота интеграции трансгена наблюдалась в результате микроинъекции конструкции в пронуклеусы зигот 1-й и 2-й групп (18,4 и 20,7%, соответственно) и значительно меньшая (11,5%) в зиготы 3-й группы. Трансгенные животные родились только в 1-й и 2-й группах. Проведенные исследования свидетельствуют, что наибольшая частота интеграции генно-инженерной конструкции в геном эмбрионов наблюдается при инъекции этих конструкций в пронуклеусы зигот, находящихся в начале или середине фазы G₁ первого клеточного цикла.

Введение

В настоящее время основным этапом технологии получения трансгенных животных является введение генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот микроинъекционным методом. Однако частота интеграции чужеродных генов в геном сельскохозяйственных животных при этом методе остается пока еще очень низкой (1-2%). Низкая частота интеграции чужеродных генов в геном хозяина является одним из основных факторов, снижающих эффективность и удорожающих технологию получения трансгенных животных (1,9).

Исходя из современных представлений цитогенетики, возникает предположение о том, что одним из факторов, от которого зависит частота интеграции трансгена, может быть стадия развития зиготы, во время которой в пронуклеусы вводится генно-инженерная конструкция. Существует предположение, что для интеграции чужеродных генов в геном хозяина необходима репликация ДНК (4) и, следовательно, для получения трансгенных животных интеграция экзогенной ДНК в хромосомную должна происходить в течение S-фазы первого клеточного цикла зиготы. Однако это предположение базируется на косвенных

данных, т.к. получение прямых экспериментальных данных о влиянии времени инъекции генно-инженерной конструкции на частоту интеграции, по мнению авторов этого предположения, связано с большими трудностями (9).

Исходя из вышеизложенного, целью исследований являлось выяснение зависимости между частотой интеграции генно-инженерной конструкции и фазой клеточного цикла зиготы, на которой эта конструкция инжектировалась в пронуклеусы.

Материал и методы

Эксперимент проводили на гибридных мышах (СВА х С57В1) первого поколения (F_1). С целью более точного определения времени осеменения доноров эмбрионов, утром за 1-2 часа до окончания темного периода самок без гормональной обработки подсаживали к самцу и через 1 час после подсадки отбирали животных с копуляционными пробками. У этих самок извлекали зиготы через разные промежутки времени после обнаружения копуляционных пробок: 5,5-7,0 ч (1-я группа); 7,5-8,5 ч (2-я группа); и 9,0-11,5 ч (3-я группа) и 12,0-15,0 ч (4-я группа). Извлечение зигот осуществляли путем промывания яйцеводов средой М2. В случае необходимости освобождения зигот от клеток кумулюса и лучистого венца их инкубировали в течение 2 мин в теплом растворе 0,1% гиалуронидазы. После этого зиготы промывали в 3-4 порциях среды М2 и переносили в капле той же среды в масляную камеру типа Фонбрюна.

Морфологическую оценку зигот и микроинъекцию в них генно-инженерной конструкции проводили под инвертированным микроскопом Diavert (Nikon), с использованием дифференциально-интерференционного контраста (оптика Номарского). Для микроинъекции использовали генно-инженерную конструкцию, включающую нуклеотидные последовательности гена человеческого гранулоцит-колониестимулирующего фактора под промотором гена αS_1 -казеина (αS_1 -Cn-G-CSF).

Микроинъекцию генно-инженерной конструкции проводили в мужской пронуклеус стеклянной иглой, имеющей внешний диаметр кончика 1,5-2,0 мкм с помощью микроманипулятора фирмы «Narishiga». Точность введения раствора экзогенной ДНК контролировали по увеличению размера пронуклеуса. Концентрация вводимой ДНК колебалась в пределах 5-8 нг/мкл. При введении в пронуклеус 1-2 пл раствора ДНК это соответствовало 500-800 копиям генно-инженерной конструкции на одну зиготу.

Зиготы, микроинжектированные генно-инженерной конструкцией, в течение суток культивировали в среде Ham F-10 с целью выяснения влияния процесса микроинъекции на жизнеспособность зигот. После

этого одну часть зигот, проявивших признаки дробления, продолжали культивировать до стадии бластоцисты в среде Ham F10, обогащенной BSA в капиллярах под газовой смесью, содержащей 5% углекислого газа, 5% кислорода и 90% азота при t 37°C, а вторую часть – трансплантировали в яйцеводы мышам-реципиентам. Псевдобеременных реципиентов подготавливали путем спаривания самок с вазэктомизированными самцами. Признаком спаривания служило наличие копуляционной пробки. Трансплантацию эмбрионов самкам-реципиентам проводили под наркозом по 4-5 штук в каждый яйцевод.

Для исключения ложноположительных результатов и определения истинной интеграции генно-инженерной конструкции на стадии бластоцисты, ДНК, выделенную из эмбриона, обрабатывали рестриктазой DpnI с целью разрушения неинтегрированной *dam*⁺ метилированной ДНК генно-инженерной конструкции. После 6 дней культивирования каждую бластоцисту переносили в 0,5 мл пробирку с 10 мкл дистиллированной воды, покрывали 20 мкл масла и замораживали при –20°C. Перед проведением полимеразной цепной реакции пробы с бластоцистами нагревали до 100°C в течение 10 минут для лизирования бластомеров и денатурации ДНК. Образцы охлаждали до комнатной температуры и в каждую пробу вносили рестриктазу DpnI в концентрации 1 U и 10-кратный буфер для DpnI (Promega). Лизаты инкубировали в течение 3 часов при 37°C. Обработку образцов протеиназой K в конечной концентрации 1 мкг/мл проводили при температуре 37°C в течение 1 часа. Для инактивации протеиназы K образцы выдерживали в течение 8 минут при 95°C.

Определение интеграции трансгена как в геном эмбрионов, так и в геном родившихся животных проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР-амплификацию ДНК эмбрионов проводили в течение 40 циклов в условиях, рекомендованных для Tag-полимеразы с некоторыми модификациями. В качестве положительного контроля использовали микроинъекцированные и сразу же замороженные зиготы, дополнительным контролем служила ДНК человека.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что генно-инженерная конструкция, введенная в пронуклеусы зигот, может оказывать существенное влияние на способность зигот к дальнейшему развитию, был проведен эксперимент, направленный на изучение влияния различных концентраций генно-инженерной конструкции, вводимой в пронуклеусы, на развитие мышинных зигот *in vitro*. Анализ результатов этого эксперимента (табл.1) показал, что генно-инженерная конструкция αS_1 -Cn-G-CSF в концентрации 2,5 и 5,0 нг/мкл (3-я и 4-я гр.), инъекцированная в пронуклеусы зигот, не оказала существенного отрицательного влияния по сравнению

с ТЕ-буфером как на развитие зигот до стадии бластоцисты (62,9 и 67,6 против 72,9%), так и на выход бластоцист из прозрачной оболочки (40,7 и 41,2% против 43,2%). И только повышение концентрации до 10,0-20,0 нг/мкл (5-я и 6-я гр.) вызвало снижение и количества зигот, развившихся до стадии бластоцисты (59,4 и 43,3%, соответственно), и бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки (34,4 и 30,0%, соответственно).

Таким образом, результаты этого исследования показали, что генно-инженерная конструкция αS_1 -Cn-G-CSF может быть использована в дальнейшей работе для получения трансгенных животных в концентрации до 10 нг/мкл без существенного снижения жизнеспособности эмбрионов.

Таблица 1. Влияние концентрации генно-инженерной конструкции, вводимой в пронуклеусы, на развитие мышинных зигот in vitro

№ гр.	Концентрация ДНК (нг/мкл)	Количество зигот								количество бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки	
		инъекция			дробившихся		развившихся до бластоцисты				
		п	п	%	п	%	п	%	п		
1	контроль	50	—	—	50	0	90	46	20	30	60
2	ТЕ.	50	37	74	35	94	27	27	29	16	32

				7		9		6		4
3	2,5	3	2	9	2	2	1	2	1	0
		4	7	,	5	,	7	,	1	,
				4		6		9		7
				7		9		6		4
4	5,0	4	3	7	3	1	2	7	1	1
		4	4	,	1	,	3	,	4	,
				3		2		6		2
				8		9		5		3
5	10,0	4	3	0	3	3	1	9	1	4
		0	2	,	0	,	9	,	1	,
				0		8		4		4
				7		5		4		3
6	20,0	3	3	7	1	3	1	3	9	0
		9	0	,	6	,	3	,		,
				0		3		3		0

Основываясь на этих результатах были проведены исследования, направленные на решение главной задачи – выяснение зависимости между стадией развития зиготы, на которой в пронуклеусы вводится генно-инженерная конструкция, и частотой ее интеграции в геном эмбрионов. Принимая во внимание тот факт, что отбор самок с копуляционными пробками проводили через 1 час после подсадки их к самцу, можно предполагать, что в среднем покрытие самок самцом происходило через 0,5 часа после подсадки к самцу. Поэтому время осеменения самок-доноров рассчитывали путем вычитания 0,5 ч от времени обнаружения копуляционных пробок.

Анализ результатов этого исследования (табл. 2) свидетельствует, что до стадии бластоцисты развилось несколько больше зигот, извлеченных и микроинъектированных через 5,5-7,0 ч после осеменения самок-доноров (1-я гр.). С увеличением времени от осеменения крольчих до микроинъекции зигот (2-я, 3-я и 4-я гр.) снижалось число эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, с 80,9 (1 гр.) до 68,4% (3-я гр.). Аналогичная тенденция сохранилась и по количеству бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки (46,8 – 1 гр., и 36,0 – 4 гр.).

Определение интеграции генно-инженерной конструкции в геном эмбрионов (табл. 2) показало, что наибольшая частота интеграции трансгена в геном эмбрионов наблюдалась в результате микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот, полученных через 5,5-7,0 ч (1 гр.) и через 7,5-8,5 ч (2 гр.) после осеменения – 18,4 и 20,7%, соответственно. Значительно меньшей (11,5%) была частота интеграции трансгена в зиготах, извлеченных через 9,0-11,5 часов после осеменения (3 гр.), однако увеличилась (до 16,6%) в зиготах, извлеченных через 12,0-15,0 часов после осеменения (4 гр.).

Таблица 2. Влияние стадии развития зиготы на частоту интеграции трансгена в геном эмбрионов (эксперимент *in vitro*)

№	Время после осеменения	Фаза клеточного цикла	Количество зигот						Количество бластоцист							
			перенесших инъекцию			дробилось			развились до бластоцисты		вышедших из прозрачной оболочки		трансгенных			
			п	п	%	п	п	%	п	п	%	п		п	%	
1	5,5-7,0	G ₁ (начало)	4	4	78,3	5	9	3	3	80,9	2	2	46,8	7	1	8,4
2	7,5-8,5	G ₁ (средина)	4	4	80,4	2	9	2	2	70,7	1	1	41,5	6	2	0,7
3	9,0-11,5	G ₁ (окончание) S (начало)	4	3	80,9	2	9	2	2	68,4	1	1	39,5	3	1	1,5
4	12,0-15,0	средина и окончание S	58	50	86,2	45	90,0	36	36	72,0	18	18	36,0	6	6	16,6

Анализ результатов этого эксперимента показал (табл. 3), что при трансплантации микроинъецированных зигот самкам-реципиентам трансгенные животные родились только в 1-й и 2-й группах, т.е. из зигот, извлеченных через 5,5-8,5 ч после осеменения.

Частота интеграции трансгена в расчете на всех родившихся мышат составила 1,4%. Сопоставление результатов частоты интеграции генно-инженерной конструкции $\alpha S1-Cn-G-CSF$ в геном эмбрионов и рожденного потомства (табл. 4) показало, что частота интеграции трансгена, выявленная в эмбрионах на стадии бластоцисты, была в 12 раз выше, чем у рожденных животных (17,0 против 1,4%) соответственно.

До настоящего времени имеется очень мало информации о том, как происходит встраивание в геном животных чужеродной ДНК, микроинъецированной в пронуклеусы зигот. Исходя из современных представлений молекулярной биологии, для встраивания чужеродной ДНК в геном эмбриона должен произойти двунитевой разрыв хромосомной ДНК пронуклеуса. Такой разрыв, наиболее вероятно, может происходить в тот период клеточного цикла зиготы, когда хроматин пронуклеусов находится в наиболее деконденсированном состоянии, а хромосомная ДНК в меньшей степени спирализована и связана с гистонами в нуклеосомах. Определение этого периода клеточного цикла зиготы может иметь существенное значение для повышения частоты интеграции генно-инженерных конструкций в геном хозяина и для повышения эффективности технологии получения трансгенных животных.

*Таблица 3. Влияние стадии развития мышинных зигот на частоту интеграции трансгена в геном рожденного потомства (эксперимент *in vivo*)*

Группа	Время (ч)	Фаза клет.	Число реципинтов		Число эмбрионов			Число потомков
			и	стало	т	н	п	

	я п о с л е о с е м е н е н и я (ч а с)	оч но го ци кла	с п о л ь з о в .			бере- мен.			р а н с п л а н т и р о в . (в с е г о)			а 1 р е ц и п и е н т .			р и ж и в л я е м о с т ь			р о д и л о с ь в с е г о			транс- генных		
			п	п	%	п	п	%	п	п	%	п	п	%	п	п	%	п	п	%			
1	5, 5 - 7, 0	G ₁ (нач ало)	2 1	1 5	71,4	2 0 2	9, 6	2 3 7	48	1	2, 1												
2	7, 5 - 8, 5	G ₁ (се ре ди на)	2 0	1 3	65,0	1 7 0	8, 5	2 5 9	44	1	2, 3												
3	9, 0 - 1, 5	G ₁ (о ко нч ан ие) S ₁ (нач ало)	7	4	57,1	6 6	9, 4	3 7 8	25	-	-												

4	1 2, 0- 1 5, 0	середина и окончание S	11	7	63,6	109	9,9	20,2	22	-	-
---	-------------------------------	---------------------------	----	---	------	-----	-----	------	----	---	---

Таблица 4. Сравнение частоты интеграции генно-инженерной конструкции α S1-Cn-G-CSF в геном эмбрионов и рожденного потомства

Показатели	Эмбрионы (бластоцисты)		Рожденные животные	
	n	%	n	%
Исследовано всего	129	100,0	139	100,0
Выявлено трансгенных	22	17,0	2	1,4

Основываясь на хорошо известном факте о том, что трансфекция соматических клеток в культуре наиболее эффективна в делящихся популяциях, Бишоп и Смит (4) пришли к выводу, что для интеграции чужеродных генов в геном соматических клеток необходима репликация хромосомной ДНК. Исходя из этого вывода, Уол и др. (9) сделали предположение, что при получении трансгенных животных микроинъекцию генно-инженерных конструкций в пронуклеусы необходимо проводить в период начинающейся S-фазы клеточного цикла зиготы.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что наибольшая частота интеграции трансгена в геном эмбрионов происходила при микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот, извлеченных через 5,5-8,5 ч после осеменения. К аналогичному выводу пришли Исабеков и Конюхов (2), которые также отмечают, что экзогенная ДНК, введенная в мужской пронуклеус зигот, выделенных через 8 ч после спаривания мышей, лучше интегрирует в геном потомства, чем при введении ее в пронуклеусы зигот, извлеченных в более поздние сроки (10-14 час). Однако в исследованиях этих авторов не были затронуты более ранние сроки извлечения зигот, чем 8 часов после осеменения.

Согласно результатам исследований большинства авторов, изучавших первый клеточный цикл в зиготах мышей (3, 5, 6), период времени от 3 до 8,5 ч после осеменения соответствует началу и середине фазы G₁ клеточного цикла зиготы. По данным Кришны и др. (6) синтез ДНК в зиготах мышей, т. е. фаза S в единичных пронуклеусах начинается через 9 ч после осеменения. Аналогичные результаты были полу-

чены Самошкиной и др. (3) в экспериментах с использованием импульсной метки, которая отмечает, что включение радиоактивной метки в пронуклеусы определенной части зигот начинается через 8-9 ч после осеменения. По данным Хаулет (5), полученным в экспериментах по оплодотворению ооцитов мышей *in vitro*, фаза S клеточного цикла зигот начинается через 11 ч после осеменения. Несмотря на то, что результаты, полученные *in vitro*, более точно отражают время оплодотворения яйцеклеток, нельзя не учитывать и тот факт, что развитие зигот и эмбрионов *in vitro* идет несколько медленнее, чем *in vivo*. Принимая во внимание результаты вышеприведенных исследований, по-видимому, следует признать, что окончание фазы G₁ и начало фазы S в зиготах мышей происходит где-то между 9-11 часами после осеменения.

Результаты наших исследований и других авторов свидетельствуют о том, что наибольшая частота интеграции генно-инженерных конструкций в геном эмбрионов наблюдается при инъекции этих конструкций в пронуклеусы зигот, находящихся в начале или середине фазы G₁ клеточного цикла, что несколько отличается от предположения о необходимости репликации хромосомной ДНК для интеграции чужеродной ДНК в геном хозяина (9). Если принять во внимание тот факт, что фаза S у мышинных зигот начинается через 9-11 ч после осеменения и продолжается 5-7 ч (3, 5), а интеграция генно-инженерных конструкций в зиготы, инъецированные этой конструкцией, через 11 ч после осеменения значительно снижается по сравнению с зиготами, инъецированными в более ранние сроки (5,5-8,5 ч) после осеменения, то складывается впечатление, что фаза S является не самым подходящим периодом для микроинъекции чужеродной ДНК в пронуклеусы зигот с целью повышения интеграции трансгена в геном хозяина. Для подтверждения этого предположения необходимо рассмотреть возможные варианты развития событий:

а) ДНК генно-инженерной конструкции, введенная в пронуклеус в фазу G₁, сразу (быстро) начинает встраиваться в хромосомную ДНК зиготы и, следовательно, нет необходимости в репликации ДНК;

б) ДНК генно-инженерной конструкции, введенная в пронуклеусы зиготы в период фазы G₁ начинает встраиваться в хромосомную ДНК не сразу, а только через определенный промежуток времени, когда начнется фаза S клеточного цикла и репликация ДНК;

в) ДНК, введенная в пронуклеус зиготы в период фазы S, т. е. в период наиболее интенсивной репликации хромосомной ДНК, должна встраиваться в геном эмбрионов с наибольшей частотой, однако экспериментальные данные свидетельствуют о снижении частоты интеграции трансгена в этот период, несмотря на то, что фаза S в мышинных зиготах продолжается 5-6 часов. Этот факт наводит на мысль о том, что репликация хромосомной ДНК не является необходимым условием для интеграции чужеродной ДНК.

Анализ этих возможных вариантов развития событий дает основание заключить, что пока не будет установлен точный механизм интеграции чужеродной ДНК в геном хозяина, микроинъецировать генно-инженерные конструкции необходимо в пронуклеусы зигот, находящихся в начальной или средней стадии фазы G_1 клеточного цикла, т. е. в более ранние сроки, как только позволяет видимость пронуклеусов.

В нашем эксперименте приживляемость эмбрионов в разных группах колебалась от 20,2 до 37,8%, что является сравнительно высоким показателем при получении потомства мышей из зигот, микроинъецированных генно-инженерной конструкцией. Однако выход трансгенных животных составил только 1,4% в расчете на все полученное потомство в четырех группах или 2,2% в 1-й и 2-й группах, в которых были выявлены трансгенные животные. Если учесть, что в среднем (в расчете на всех реципиентов) приживляемость микроинъецированных эмбрионов составила 25%, то выход родившихся трансгенных животных должен быть в 4 раза меньше, чем число трансгенных бластоцист (табл. 4). Однако в эксперименте число родившихся трансгенных животных было в 12 раз меньше, чем трансгенных бластоцист, определенных на 6-й день культивирования *in vitro*.

Это различие в количестве трансгенных бластоцист и родившихся трансгенных животных, по-видимому, можно объяснить с позиций негомологичной и экстрахромосомной рекомбинации. В экспериментах на культуре животных клеток установлено, что в большинстве случаев стабильная трансформация связана с рекомбинационным введением трансформирующей ДНК в геном клетки. При этом, как реплицирующие, так и нереплицирующие векторы способны вызывать инсерционную трансформацию. В этих случаях интеграция чужеродной ДНК в клетки животных происходит по принципу негомологичной рекомбинации в случайные участки генома. Наряду с этим в животных клетках имеет место и экстрахромосомная рекомбинация, которая чаще всего оказывается нестабильной.

Причем, как показали исследования (10) на культуре клеток, экстрахромосомная рекомбинация в 10-15 раз чаще в клетках микроинъецированных линейной ДНК в S фазе, чем в клетках инъецированных в G_1 фазе клеточного цикла. Однако частота стабильной трансформации была почти одинаковой независимо от фазы клеточного цикла, во время которой проводилась микроинъекция.

Можно предположить, что в нашем эксперименте встраивание трансгена в зиготы, микроинъецированные в период S фазы клеточного цикла (3 и 4 гр.) происходило путем нестабильной экстрахромосомной рекомбинации, в результате которой интеграция наблюдалась только на стадии эмбрионов и не была обнаружена у родившихся потомков, что также свидетельствует о целесообразности микроинъекции генно-

инженерных конструкций в зиготы, находящиеся в G₁ фазе первого клеточного цикла.

Нельзя исключить и такое предположение, что невысокий процент родившихся трансгенных животных, по сравнению с количеством трансгенных эмбрионов на стадии бластоцисты, в нашем эксперименте (табл. 4) может быть обусловлен и не абсолютной тканеспецифичностью экспрессии трансгена. Нами для получения трансгенных животных была использована конструкция, включающая человеческий ген гранулоцит-колониистимулирующий фактор (Г-КСФ) под промотором гена α S₁-казеина быка (α S₁-Cn-G-CSF), который должен обеспечивать тканеспецифическую экспрессию этой конструкции в клетках молочной железы. Г-КСФ является высокоактивным веществом, оказывающим свое регулирующее действие в очень низких концентрациях, поэтому при малейшем нарушении тканеспецифичности экспрессии гена Г-КСФ (подтекание промотора) может происходить попадание этого высокоактивного вещества в кровеносную систему плода, что может приводить к его гибели. Это предположение находит подтверждение и в исследованиях других авторов (7, 8). В связи с этим появилась идея использовать для получения трансгенных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества фармакологического назначения, генно-инженерные конструкции, обеспечивающие экспрессию этих веществ в неактивной форме, а после выделения их из молока превращать в активную форму в лабораторных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brem J. Zum Stand des Gentransfers beim Nutritier. Zuchtungskunde, 1991, 63: 191-200.
2. Исабеков Б.С., Конюхов Б.В. Анализ факторов, влияющих на эффективность получения трансгенных мышей. Онтогенез. 1989, 20, 1: 28-32.
3. Самошкина Н.А., Голинский Г.Ф., Дыбан А.П. Исследование первого цикла репликации ДНК в эмбриогенезе мышей при помощи микроинъекций Н-тимидина в цитоплазму оплодотворенных яйцеклеток. Онтогенез. 1988, 19, 6: 582-590.
4. Bishop J.O., Smith P. Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA. Mol. Biol. Med. , 1989, 6: 283.
5. Howlett S.K., Bolton V.N. Sequence and regulation of morphological and molecular events during the first cell cycle of mouse embryogenesis. J. Embryol. and Exp. Morphol., 1985, 87: 175-206.
6. Krishna M., Generoso W. Timing of sperm penetration, pronuclear formation, pronuclear DNA synthesis and first cleavage in naturally ovulated mouse eggs. J. Exp. Zool., 1977, 202: 245-251.
7. McFadden T.B., Akers R.M., Karmar G.W. α -lactalbumin in bovine serum: relationship with udder development and function. J. Dairy Sci., 1987, 70: 259-264.

8. Robinson G.W., McKnight R.A., Smith G.H. et al. Mammary epithelial cells undergo transient differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. *Development*. 1995, 121: 2079-2083.
9. Wall R.J., Korr D.E., Bondioli K.R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80: 2213-2224.
10. Wong E.A., Capecchi M.R. – Effect of cell-cycle position on transformation by microinjection. –*Somat. Cell Mol. Genet.* 1985, 11:43-51.

АНАЛИЗ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ МЫШЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЗИГОТ, МИКРОИНЪЕЦИРОВАННЫХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ

Е.А. Попова, А.С. Кривохарченко, В.П. Рябых, Л.И. Вильянович
Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

Изучали влияние разных концентраций генно-инженерной конструкции, микроинъецированной в пронуклеусы мышинных зигот, на их жизнеспособность и зависимость приживляемости этих зародышей от стадии развития, на которой проводилась трансплантация эмбрионов самкам-реципиентам. Результаты исследований показали, что жизнеспособность микроинъецированных зигот зависит от качества вводимой в пронуклеусы генно-инженерной конструкции и от ее концентрации. Приживляемость зигот, трансплантированных самкам-реципиентам сразу после микроинъекции в их пронуклеусы генно-инженерной конструкции практически не отличалась от приживляемости эмбрионов, достигших 2-клеточной стадии при культивировании in vitro и трансплантированных на следующий день. Однако беременность самок-реципиентов после трансплантации им микроинъецированных зигот была выше на 31,9%.

Введение

Одним из наиболее перспективных направлений биотехнологии сельскохозяйственных животных является технология получения трансгенных животных, продуцирующих с молоком биологически активные вещества лекарственного назначения. До настоящего времени недостаточно изученными аспектами ее остаются низкая частота интеграции трансгена в геном хозяина и низкая приживляемость эмбрионов, развивающихся из зигот, микроинъецированных чужеродной ДНК. В связи с этим, в настоящее время изучаются факторы молекулярно-биологического и эмбриологического характера, влияющие на эффективность технологии получения сельскохозяйственных трансгенных животных.

Основным способом получения трансгенных животных остается микроинъекция рекомбинантной ДНК в пронуклеусы зигот. Общая эффективность получения трансгенных сельскохозяйственных животных составляет в среднем лишь 0,5%, в то время как у мышей этот показатель достигает 3% (1).

На эффективность технологии трансгенеза влияют генно-инженерные факторы (качество конструкции, ее концентрация и др.) и эмбриолого-физиологические (жизнеспособность микроинъецированных эмбрионов и их приживляемость в организме животных реципиентов). До настоящего времени не определена оптимальная концентрация рекомбинантной ДНК, предназначенной для микроинъекции в пронуклеусы зигот, при введении которой будет достигнута наибольшая частота интеграции трансгена и эффективность развития эмбрионов. В экспериментах по получению трансгенных животных используется ДНК в концентрации от 1 до 10 нг/мкл. Причем, применение слишком высоких концентраций (например, 10 нг/мкл) резко снижает выживаемость эмбрионов (2).

Наряду с микроинъекцией генно-инженерных конструкций в пронуклеусы зигот, одним из важных этапов технологии получения трансгенных мышей является трансплантация зародышей псевдобеременным реципиентам, которую обычно проводят в день инъекции (3) или на следующий, трансплантируя эмбрионы, находящиеся на 2-клеточной стадии. Культивирование *in vitro* в течение суток дает возможность отобрать тех зародышей, которые пережили инъекцию и не подверглись блоку развития на 1-клеточной стадии. Однако остаются неизученными вопросы, касающиеся влияния культивирования эмбрионов в условиях *in vitro* на их приживляемость в организме самки-реципиента. Удобной моделью для проведения эмбриотехнологических исследований являются лабораторные животные, а именно, мыши.

Целью наших исследований было изучение влияния разных концентраций генно-инженерной конструкции, микроинъецируемой в пронуклеусы мышинных зигот, на их жизнеспособность и зависимость приживляемости этих зародышей от стадии развития, на которой проводилась трансплантация эмбрионов самкам-реципиентам.

Материал и методы

Работа проведена на гибридных мышах (СВА х С57В1)F1. Зиготы получали путем промывания яйцеводов средой Дюльбекко через 7-10 ч после спаривания мышей. В случае необходимости освобождения зигот от клеток кумулюса и лучистого венца, их инкубировали в течение 2 мин в теплом растворе 0,1% гиалуронидазы. После чего зиготы промывали в 3-4 порциях среды М2 и переносили в капле той же среды в масляную камеру типа Фонбрюна.

Морфологическую оценку зигот и микроинъекцию в них генно-инженерных конструкций проводили под инвертированным микроскопом Diavert (Nikon), с использованием дифференциально-интерференционного контраста (оптика Номарского). В камеру помещали по 10-12 зигот.

Микроинъекцию генно-инженерной конструкции проводили в мужской пронуклеус стеклянной иглой, имеющей внешний диаметр кончика 1,5-2,0 мкм с помощью микроманипулятора фирмы «Narishiga». Точность введения раствора экзогенной ДНК контролировали по увеличению размера пронуклеуса. Концентрация вводимой ДНК колебалась в пределах 2,5-10 нг/мкл. При введении в пронуклеус 1-2 пл раствора ДНК это соответствовало 500-800 копиям генно-инженерной конструкции на одну зиготу.

После микроинъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеус, зиготы трансплантировали псевдобеременным реципиентам или в течение суток культивировали в среде Хема-F10, в силиконизированных капиллярах, в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Псевдобеременных реципиентов получали путем спаривания самок с вазэктомизированными самцами. Трансплантацию эмбрионов самкам-реципиентам проводили под наркозом по 3-7 штук в каждый или только в один яйцевод.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что генно-инженерная конструкция, введенная в пронуклеусы зигот, может оказывать существенное влияние на жизнеспособность зигот, был проведен эксперимент, направленный на изучение влияния генно-инженерной конструкции, включающей нуклеотидные последовательности гена эритропоэтина человека под промотором αS1 -казеина крупного рогатого скота ($\alpha\text{S1-Cn-Epo}$) на развитие мышечных зигот, микроинъецированных этой конструкцией в один из пронуклеусов.

Анализ результатов этого исследования (табл. 1) показал, что микроинъекция в пронуклеусы зигот буферного раствора трис-ЕДТА (ТЕ-буфер), в котором растворяли генно-инженерную конструкцию (3-я гр.), на 16,6% снизила количество эмбрионов, достигших стадии бластоцисты (71,4 против 88% в контроле), и на 13% количество бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки (43,0 против 56,0% в контроле). Снижение жизнеспособности зигот на 13-16% под влиянием микроинъекции в них генно-инженерной конструкции признается оптимальным многими исследователями, работающими в этой области (2).

Таблица 1. Влияние генно-инженерной конструкции $\alpha S1$ -Сп-Еро на развитие мышинных эмбрионов

№ гр.	Вещество, инъецируемое в пронуклеус	Количество зигот						Количество бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки		
		инъецировано	выжило после инъекции		дробилось		развились до бластоцисты		n	%
			n	n	%	n	%	n		
1	Контроль (без инъекций)	25	–	–	25	100,0	22	88,0	14	56,0
2	ГИК- α -S1-Сп-Еро	81	60	74,1	52	86,6	33	55,0	12	20,0
3	ТЕ-буфер	38	28	73,7	25	89,3	20	71,4	12	43,0

Однако микроинъекция в пронуклеусы зигот генно-инженерной конструкции $\alpha S1$ -Сп-Еро (2-я группа) достоверно снизила количество жизнеспособных зигот, вышедших из прозрачной оболочки (20,0% против 43,0%) по сравнению с 3-й группой, в которой инъецировали ТЕ-буфер ($p < 0,05$).

Такое снижение выхода бластоцист из прозрачной оболочки в 2 раза, по общепризнанным мерам, считается весьма значительным и свидетельствует о токсическом эффекте генно-инженерной конструкции. При этом токсический эффект конструкции может быть обусловлен несколькими причинами, а именно: плохой очисткой ДНК; слишком высокой концентрацией вводимой ДНК; временной экспрессией введенной ДНК.

Исходя из результатов этого эксперимента, в дальнейшей работе по получению трансгенных животных была использована генно-инженерная конструкция, включающая нуклеотидные последовательности человеческого гена гранулоцит-колониестимулирующего фактора под промотором $\alpha S1$ -казеина крупного рогатого скота ($\alpha S1$ -Сп-G-CSF).

В первой серии экспериментов было изучено влияние различных концентраций генно-инженерной конструкции, вводимой в пронуклеусы, на развитие мышинных зигот *in vitro*. Анализ результатов этого эксперимента (табл. 2) показал, что введение в пронуклеус зигот ДНК исследуемых концентраций достоверно снижало способность микроинъецированных зигот развиваться до стадии бластоцисты по сравнению с этим показателем контрольной группы (1 гр.) ($p < 0,01$).

Таблица 2. Влияние концентрации генно-инженерной конструкции, вводимой в пронуклеусы, на развитие мышинных зигот *in vitro*

№ гр.	Концентрация ДНК (нг/мкл)	Количество зигот								Количество бластоцист, вышедших из прозрачной оболочки	
		инъецированных ГИК	переживших инъекцию		дробившихся		развившихся до бластоцисты		п	%	
			п	п	%	п	%	п			%
1	Контроль	50	–	–	50	100,0	46	92,0	30	60,0	
2	ТЕ	50	37	74,0	35	94,6	27	72,9	16	43,2	
3	2,5	34	27	79,4	25	92,6	17**	62,9	11	40,7	
4	5,0	44	34	77,3	31	91,2	23**	67,6	14	41,2	
5	10,0	40	32	80,0	30	93,8	19**	59,4	11*	34,4	
6	20,0	39	30	77,0	16	53,3	13***	43,3 ⁺⁺	9**	30,0	

Достоверность разницы между группами по сравнению с контролем.

показатель формирования бластоцисты:

** 1-3, 4, 5-я, $p < 0,01$; *** 1-4, $p < 0,001$;

показатель вылупления бластоцисты из zona pellucida:

* 1-5-я, $p < 0,05$; ** 1-4-я, $p < 0,01$;

достоверность разницы между исследуемыми группами и 2-й группой:

++ 2-6-й, $p < 0,01$

Однако концентрация генно-инженерной конструкции, соответствующая 2,5, 5,0 и 10 нг/мкл (3, 4 и 5-я группы), инъецированная в пронуклеусы зигот, не оказала существенного отрицательного влияния на развитие зигот до стадии бластоцисты по сравнению с ТЕ-буфером (2-я гр.) (62,9, 67,6% и 59,4 против 72,0%).

Полученные результаты типичны для экспериментов по получению трансгенных животных методом микроинъекции экзогенной ДНК в пронуклеусы зигот. Однако увеличение концентрации генно-инженерной конструкции до 20 нг/мкл достоверно снизило количество бластоцист, развившихся из микроинъецированных зигот, по сравнению с группой эмбрионов, микроинъецированных ТЕ-буфером (43,3% против 72,9%) ($p < 0,01$).

Таким образом, в результате проведенного эксперимента выявлена тенденция снижения способности мышинных зигот к развитию до стадии бластоцисты и вылупления зародышей из zona pellucida по мере увеличения концентрации генно-инженерной конструкции, используемой для микроинъекции в пронуклеусы.

Результаты эксперимента по изучению влияния различной концентрации генно-инженерной конструкции, микроинъецируемой в пронуклеусы мышинных зигот, на приживляемость эмбрионов в организме самки-реципиента (табл. 3) свидетельствуют об отсутствии различий в приживляемости эмбрионов, инъецированных чужеродной ДНК в концентрации 4,0-5,0 или 8,0-10,0 нг/мкл.

Таблица 3. Влияние концентрации генно-инженерной конструкции на приживляемость микроинъецированных эмбрионов *in vivo*

№ гр.	Концентрация ДНК (нг/мкл)	Число реципиентов			Число эмбрионов			Число родившихся потомков
		использовано	стало беременными		трансплантировано (всего)	на 1 реципиента	приживляемость	
			п	п				
1	4,0-50,	18	13	72,2	128	9,8	39,8	51
2	80,-10,0	9	6	66,7	73	12,2	43,8	32

Таким образом, проведенные исследования дают основание полагать, что генно-инженерная конструкция α S1-Cn-G-CSF может быть использована в дальнейшей работе для получения трансгенных животных в концентрации до 10 нг/мкл без существенного снижения жизнеспособности эмбрионов.

Вторая серия экспериментов была посвящена изучению зависимости приживляемости микроинъецированных зародышей от стадии развития, на которой проводится трансплантация их псевдобеременным реципиентам. Данные представлены в табл. 4.

Обращает на себя внимание тот факт, что число самок-реципиентов, не давших потомства, достоверно выше во 2-й группе по сравнению с 1 группой. Так, процент беременности для 1 группы составил 90%, а для 2-й – 61,9. Однако разницы по приживляемости микроинъецированных эмбрионов в исследуемых группах не выявлено. Приживляемость зигот составила 36,1%, а 2-клеточных эмбрионов 37,4%. При трансплантации зигот появление мертворожденных мышат наблюдалось в 4,9% случаев, а при трансплантации эмбрионов на 2-клеточной стадии 7,5% (разница между показателями недостоверна).

Таблица 4. Зависимость приживляемости эмбрионов, микроинъецированных генно-инженерной конструкцией, от стадии их развития в момент трансплантации

Показатели	Стадия развития	
	зигота (1-я гр.)	2-клеточная (2-я гр.)
Число самок-реципиентов	20	21
из них беременные, п	18	13
%	90	61,9
Количество трансплантированных эмбрионов (общее):	183	176
в среднем на 1 реципиента	9,4	8,2
Число родившихся потомков:	61	40

из них мертворожденные, n	3	3
%	4,9	7,5
Приживляемость, %	36,1	37,4

Вероятно, что физиологическая среда яйцеводов является наиболее благоприятной для нормального развития зародышей после процедуры микроинъекции по сравнению с культивированием эмбрионов в условиях *in vitro*. В связи с тем, что трансплантация эмбрионов проводилась нами самкам первого дня псевдобеременности, можно предположить, что снижение процента беременности при трансплантации зародышей на 2-клеточной стадии может быть связано со степенью ее синхронизации.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о зависимости жизнеспособности зигот в условиях *in vitro* от вводимой в пронуклеусы генно-инженерной конструкции. Концентрация генно-инженерной конструкции (G-CSF), соответствующая 2,5; 5,0 и 10,0 нг/мкл, не оказала существенного отрицательного влияния на развитие микроинъекцированных мышинных зигот по сравнению с введением ТЕ-буфера. Увеличение ее до 20 нг/мкл достоверно снизило количество бластоцист, развившихся из микроинъекцированных зигот. Поэтому обязательным этапом работ по получению трансгенных сельскохозяйственных животных должно быть изучение влияния различных генно-инженерных конструкций на развитие мышинных эмбрионов *in vitro*. Анализ результатов проведенного эксперимента показал, что генно-инженерная конструкция, содержащая нуклеотидные последовательности гена гранулоцит-колониестимулирующего фактора человека под промотором α S1-казеина быка (G-CSF), может быть использована в концентрации до 10 нг/мкл без существенного снижения жизнеспособности эмбрионов. Приживляемость зигот, трансплантированных самкам-реципиентам сразу после микроинъекции в их пронуклеусы генно-инженерной конструкции практически не отличалась от приживляемости эмбрионов, достигших 2-клеточной стадии при культивировании *in vitro* и трансплантированных на следующий день. Однако беременность самок-реципиентов после трансплантации им микроинъекцированных зигот была выше на 31,9%. Следовательно, наибольший процент беременности самок-реципиентов может быть получен при трансплантации им микроинъекцированных зародышей на стадии зиготы. В целях повышения общей эффективности технологии трансгенеза полученные данные могут быть использованы в работах по получению трансгенных лабораторных и сельскохозяйственных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брем Г., Кройслих Х., Штранцингер Г. Экспериментальная генетика в животноводстве. М., 1995.
2. Brinster R.L., Chen H.Y., Traumbauer M.E. et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjection eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1985, 82: 4438-4442.
3. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J. et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1980, 77: 7380-7384.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА IN VITRO

Г.П. Маленко

Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

В обзоре обобщены данные литературы о развитии и современном состоянии вопроса культивирования эмбрионов крупного рогатого скота вне организма. Рассматриваются условия, обеспечивающие развитие эмбрионов крупного рогатого скота от зиготы до расширенной и вылупившейся из прозрачной оболочки бластоцисты in vitro без сокультивирования с соматическими клетками.

Введение

Технология получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма позволяет иметь реальный источник зародышей на ранних стадиях развития для использования как в научно-исследовательских, так и в практических целях. Однако относительно невысокие показатели выхода и жизнеспособности эмбрионов, полученных in vitro, обуславливают необходимость совершенствования отдельных этапов технологии. Особенно актуальна проблема создания эффективной системы культивирования эмбрионов крупного рогатого скота in vitro от зиготы до стадии расширенной и вылупившейся бластоцисты. Ранние зародыши крупного рогатого скота успешно развиваются в яйцеводе промежуточного реципиента. Культивирование в яйцеводе кролика неоднократно использовалось в технологии трансплантации при транспортировке зародышей на далекие расстояния, в технологии in vitro дозревания и оплодотворения ооцитов для получения зародышей крупного рогатого скота на стадии, подходящей для последующей нехирургической трансплантации в матку реципиента (1-6). Успешно развивались ранние эмбрионы крупного рогатого скота в яйцеводе промежуточного реципиента овцы (7-11), телки (12-14). Однако при использовании временных реципиентов для культивирования зародышей крупного рогатого скота серьезными недостатками являются большая трудоемкость и высокая стоимость метода, опасность заражения эмбрионов, высокий

процент потери эмбрионов. Поэтому многочисленные исследования были направлены на разработку методов культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*.

Системы культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. При культивировании в комплексных тканевых культуральных средах, таких как 199, развитие эмбрионов крупного рогатого скота останавливается на стадии 8-16 бластомеров, наблюдается так называемый 8-16-клеточный блок развития. Первые системы для культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* основывались на попытке создать условия подобные яйцеводу путем сокультивирования эмбрионов с эпителиальными клетками яйцевода (ЭКЯ). Сокультивирование ранних эмбрионов крупного рогатого скота с суспензией или монослоем эпителиальных клеток яйцевода достоверно улучшало их развитие по сравнению с культивированием просто в среде (15-19). Монослой клеток кумулюса также способствует развитию эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* (20-27). Было получено потомство в результате трансплантации бластоцист, развившихся в системе сокультивирования с клетками кумулюса (28-30). Более того, такие бластоцисты были успешно заморожены и при последующей их трансплантации родились телята (31, 32). Достоверно увеличивало развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* сокультивирование с кусочками трофобласта (33-35).

Хотя к настоящему времени разработана эффективная система сокультивирования эмбрионов крупного рогатого скота с несколькими типами соматических клеток, у нее есть серьезный недостаток: необходимость получать каждый раз новую суспензию соматических клеток, что вносит во всю технологию элемент нестабильности. Преодолеть этот недостаток оказалось возможным путем приготовления кондиционированной среды или использования перевиваемых линий клеток. Вполне сопоставимые результаты были получены при культивировании ранних эмбрионов крупного рогатого скота с эпителиальными клетками яйцевода или в среде, кондиционированной на этих клетках (16, 36). При этом эмбриотрофная активность кондиционированной среды была стабильна по крайней мере один цикл замораживания-оттаивания и стабильна при хранении при -70°C в течение нескольких недель (37). Кондиционирование среды позволяет заготовить некоторое ее количество, хранить в замороженном виде и при использовании аликвот иметь стабильные условия культивирования зародышей *in vitro* в серии экспериментов (38-44).

В качестве другой альтернативы стабилизации условий культивирования ранних зародышей крупного рогатого скота используется перевиваемая линия клеток. При механическом диспергировании трофобласта эмбрионов крупного рогатого скота в возрасте 15 дней была получена клеточная линия ВТ1, которая за 10 пассажей не меняла мор-

фологию. Клеточная линия ВТІ и кондиционированная на ней среда были способны поддерживать развитие полученных *in vitro* зародышей крупного рогатого скота до стадии морулы и бластоцисты (45). Более широкое распространение получила клеточная линия Buffalo Rat Liver (BRL). Одной из предпосылок использования клеток BRL явилось то, что эта клеточная линия продуцирует leukemia-inhibiting factor (LIF) – полипептид, способствующий росту, но не дифференциации стволовых клеток мыши (46). Линия клеток BRL постоянна и легко поддерживается *in vitro*. Таким образом подтвердилось, что соматические клетки могут оказывать эмбриотрофное влияние, которое не является специфичным или видоспецифичным для эпителиальных клеток репродуктивного тракта (47).

К настоящему времени точная роль клеток-помощниц при сокультивировании или кондиционировании среды не установлена. Предположительными механизмами могут быть: образование клетками компонентов, стимулирующих эмбриональный рост (положительное кондиционирование), или удаление эмбриотоксичных субстанций из культурального окружения (отрицательное кондиционирование), или оба этих фактора (40, 48-50). В какой степени положительное или отрицательное кондиционирование играет роль в данной системе зависит, вероятно, от типа соматических клеток и от используемой среды (51). Более того, сообщалось о развитии полученных вне организма эмбрионов крупного рогатого скота в среде 199 без добавок на том же уровне, как и в среде, кондиционированной на эпителиальных клетках яйцевода. Авторы отнесли это за счет жесткого контроля за качеством воды, используемой для приготовления среды, и соответствующих общих условий культивирования (48, 49). Высказывалось мнение, что блок развития *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота на стадии 8-16 клеток является артефактом, который может быть использован как хороший показатель качества культуральной системы (52). Тем не менее, для культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*, комплексные тканевые среды используются только в системе сокультивирования с соматическими клетками или как кондиционированные среды.

Культивирование эмбрионов крупного рогатого скота в простых солевых средах. Предпринимались многочисленные усилия по созданию бесклеточной системы культивирования зародышей крупного рогатого скота *in vitro*. При этом преодоление 8-16-клеточного блока развития зародышей было обеспечено за счет применения простых солевых сред (48, 49, 53-59).

Для культивирования эмбрионов крупного рогатого скота широко используется среда SOF, разработанная на основе биохимического анализа жидкости яйцевода овцы (53). В среде SOF от зиготы до бластоцисты развивалось 85,2% полученных *in vivo* зародышей, в том чис-

ле 71,4% до стадии вылупившейся бластоцисты (59). При культивировании в среде SOF с 20% сыворотки 1- и 2-8-клеточных зародышей крупного рогатого скота, полученных *in vitro*, не отмечалось какого либо специфического блока на какой-либо стадии развития (58, 60, 61). Было показано, что SOF без добавления сыворотки может успешно поддерживать развитие эмбрионов, получаемых *in vitro* (62).

Massip et al. (63) представили обзор о результатах трансплантации эмбрионов, полученных *in vitro* при различных культуральных условиях в Бельгии, Германии и Франции. Судя по стельности и отелам, способность к развитию эмбрионов, полученных в среде SOF с добавлением сыворотки (при 5% O₂!) подобна тому, что у эмбрионов, полученных при культивировании в кондиционированной комплексной среде или при сокультивировании с соматическими клетками. Но преимуществом такой стандартной системы является простота, воспроизводимость и возможность улучшать ее путем добавления активных факторов. Некоторые другие простые безбелковые (48, 49, 55, 56, 64, 65) и с включением альбумина (57-59, 66) среды также способны поддерживать развитие эмбрионов крупного рогатого скота до стадии бластоцисты.

В литературе был предложен термин «defined» medium, «определенная» среда. Предполагается, что это такая среда, которая готовится на основе идентифицируемых компонентов перед культивированием эмбрионов, хотя это не исключает возможно имеющегося загрязнения отдельных составляющих какими-то неизвестными компонентами. Как правило, это простые солевые среды. В качестве крупномолекулярных соединений, предотвращающих слипание и прилипание эмбрионов к пипетке и стенкам сосуда используют polyvinyl-alcohol (PVA) или polyvinyl-pyrrolidone (PVP). Если в состав таких сред входит альбумин, их правильнее обозначать как «semidefined» («полуопределенные») среды (67). «Определенная» среда позволяет: 1) стандартизировать систему культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*, 2) устранять использование дополнительных продуктов животноводства, 3) изучать потребности эмбрионов, обеспечивающие их развитие.

Концентрация NaCl в простой солевой среде является важным фактором для развития эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* до стадии бластоцисты. Из тестируемых концентраций более эффективными были 89 и 101 мМ NaCl по сравнению с 64, 76 или 114 мМ (65). При культивировании эмбрионов крупного рогатого скота увеличение концентрации NaCl с 95 до 108-122 мМ в среде достоверно снижало образование бластоцист (68). Потребность в фосфате в процессе развития эмбрионов крупного рогатого скота сильно отличается от потребности эмбрионов хомяков, у которых развитие до 8-клеточной стадии полностью блокируется фосфатом (69). Присутствие адекватной кон-

центрации фосфата 0,35 мМ в среде с аминокислотами, но без глюкозы, существенно для развития эмбрионов крупного рогатого скота (55).

При культивировании эмбрионов млекопитающих обычно используют газовую фазу с 5% CO₂, что в сочетании с 25 мМ NaHCO₃ в среде обеспечивает pH среды 7,2-7,4. Концентрация кислорода в яйцеводах и матке составляет от 5 до 10% у крыс (70, 71), кроликов (72, 73), обезьян (73, 74) и изменяется в зависимости от стадии эстрального цикла (75). Маточное окружение ко времени имплантации эмбрионов может быть местом с пониженным содержанием кислорода (76). В условиях *in vitro* эмбрионы крупного рогатого скота в отсутствие соматических клеток также развиваются успешнее, если газовая фаза содержит меньше кислорода, чем воздух, и хорошо развиваются при 20% O₂ в присутствии соматических клеток (77). Так, газовая фаза с 5% O₂ была предпочтительнее, если эмбрионы культивировались в среде SOF или 199 без соматических клеток. В присутствии эпителиальных клеток яйцевода газовая фаза не оказывала существенного влияния при культивировании в среде SOF, но в среде 199 зародыши успешнее развивались в воздухе (61, 78, 79). Выход бластоцист в безбелковой среде SOF с добавлением аминокислот, инсулина и PVA при культивировании в атмосфере с 5% O₂ был вдвое выше, чем при 20% O₂ (80).

Культивирование эмбрионов при высоком содержании кислорода может способствовать образованию свободных радикалов (81, 82), которые могут оказаться повреждающим фактором для эмбрионального развития (83). Было высказано предположение, что именно образование свободных радикалов вызывает блок развития эмбрионов крупного рогатого скота при культивировании *in vitro*, включая и 8-16-клеточный блок (84, 85). Эти предположения основываются на улучшении развития эмбрионов и на различиях в уровне внутриклеточной H₂O₂ в присутствии различных поглотителей свободных радикалов (85-88) или при снижении концентрации кислорода в газовой фазе (85, 89-91). Повреждающее действие свободных радикалов предотвращается антиоксидантами, которые нейтрализуют активированные формы кислорода. Имеются многочисленные неферментные антиокислительные агенты, включая витамины E и C, β-каротины, урат (O₂ – оксидоредуктаза), таурин, гипотаурин. Специфические антиокислительные ферменты образуются клетками и способны дезактивировать O₂, H₂O₂, и органические перекиси (82, 85). Свободные радикалы могут быть разрушены такими ферментами, как superoxide dismutase (SOD). Таурин обнаружен в относительно большом количестве в жидкости женского репродуктивного тракта (92). Показано, что развитие эмбрионов при культивировании без соматических клеток в среде 199 в атмосфере с 20% O₂ достоверно улучшалось при добавлении гипотаурина или SOD (93). Среда с добавлением таурина и гипотаурина эффективна для развития эмбрионов свиньи от зиготы до бластоцисты (94). Таурин в кон-

центрации 7 мМ увеличивал выход бластоцист крупного рогатого скота *in vitro* с 34% до 42% (95).

Harvey et al. (96) сопоставили экспрессию антиоксидантных ферментов у успешно развивающихся *in vitro* эмбрионов мышей и эмбрионов крупного рогатого скота, для которых развитие *in vitro* в большей мере зависит от положительного влияния сокультивирования с соматическими клетками. Оказалось, что эмбрионы мыши синтезируют более полный ряд антиокислительных соединений, чем культивируемые эмбрионы крупного рогатого скота. Возможно, эмбрионы крупного рогатого скота не обладают полным набором антиокислительных энзимов, необходимых для нейтрализации свободных радикалов. В то же время все 5 исследовавшихся в данной работе антиокислительных ферментов постоянно экспрессируются как монослоем клеток яйцевода, так и культурой пузырьков эпителиальных клеток яйцевода в течение 8 дней культивирования, чем также может объясняться положительное влияние этих клеток на развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* при сокультивировании. Возможно, соматические клетки смягчают повреждающий эффект высокой концентрации кислорода путем снижения парциального давления кислорода в непосредственной близости к эмбриону или путем образования антиоксидантов (97, 98).

Большинство лабораторных химикатов содержат следы железа, достаточные для катализа образования высокотоксичных радикалов (99). EDTA, трансферрин и другие железо-связывающие агенты обеспечивают развитие *in vitro* эмбрионов штаммов мышей с блоком развития за счет хелатирования ионов железа (85).

Потребность ранних зародышей крупного рогатого скота в энергетических веществах и аминокислотах. Во время раннего развития мышинных эмбрионов, имеющих блок развития на 2-клеточной стадии, глюкоза может блокировать некоторые значимые метаболические процессы, а глутамин может быть привилегированным энергетическим субстратом (100, 101). Развитие зигот овец до бластоцисты может быть достигнуто в отсутствие углеводов в среде, содержащей заменимые аминокислоты (102). Эмбрионы крупного рогатого скота не способны дробиться без энергетических источников в среде. Ни глюкоза, ни глутамин (0,2 мМ) не способны поддержать дробление эмбрионов крупного рогатого скота (103). Более того, глюкоза повреждает дробление ранних эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* (36, 78, 104-108). При добавлении глюкозы в концентрации 5,56 мМ в среду в возрасте эмбрионов 8, 48 или 96 часов от начала оплодотворения повреждается развитие зародышей крупного рогатого скота (55, 109) и в дальнейшем снижается выход бластоцист (104, 105, 109, 110).

Эмбрионы крупного рогатого скота до 16-клеточной стадии мало используют глюкозу (111). Заметное увеличение метаболизма глю-

козы происходит не ранее 8-16-клеточной стадии, что соответствует времени активирования генома эмбриона (84, 112). На этих более поздних стадиях развития глюкоза необходима для образования бластоцист (108, 113-115) и для процесса вылупления из прозрачной оболочки (112). В среде без сыворотки и соматических клеток добавление глюкозы в среду стимулировало пролиферацию клеток эмбрионов старше 120 часов (116).

Много работ посвящено определению оптимального уровня и сроков включения глюкозы в среду. При добавлении глюкозы через 42-44 часа от начала оплодотворения по развитию зародышей до бластоцисты различий между 1,5 и 3,0 мМ глюкозы не было, но 5,0 мМ глюкозы оказали повреждающий эффект (110). Если глюкозу добавляли к среде mTLP-PVA с аминокислотами через 120 часов от начала оплодотворения, пропорция бластоцист Д8 и расширенных бластоцист Д9 была достоверно выше при содержании глюкозы 2,78 и 5,56 мМ, чем при 0-1,39 и 11,12 мМ (55). В последующих работах было уточнено, что уровень глюкозы 4,17 или 5,56 мМ в этот период эффективнее, чем 2,78 мМ (64, 109, 115).

По данным Matsuyama et al. (117) в первые 3 дня культивирования зародышей оптимальным было не полное отсутствие глюкозы в среде, а включение ее в количестве 0,188 мМ. При культивировании зародышей в возрасте 4-8 дней наиболее эффективным оказался исходный уровень глюкозы в SOF 1,5 мМ. Кроме того, за счет включения 10% сыворотки крови человека уровень глюкозы в среде уже составлял 0,58 мМ. И в итоге по данным этих авторов оптимальный уровень глюкозы в среде составил 0,786 (0,188+0,58) и 2,08 (1,5+0,58) мМ для культивирования зародышей крупного рогатого скота в возрасте Д1-3 и Д4-8, соответственно. Содержание глюкозы 3 и 5 мМ в среде на Д1-3 и 5 мМ на Д4-8 снижало развитие зародышей до стадии бластоцисты. Для жидкости яйцевода крупного рогатого скота характерно низкое содержание глюкозы: по разным данным от 50 мкМ до 200 мкМ (118).

Эмбрионы крупного рогатого скота, полученные *in vitro*, могут развиваться в присутствии относительно высоких концентраций одного лактата, но оптимальное развитие происходит, если одновременно присутствуют пируват и лактат. Если пируват добавлялся как единственный энергетический субстрат, то концентрации выше 1 мМ снижала процент эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты. Максимальные концентрации лактата и пирувата, способствующие развитию эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*, составляли 2,5-5,0 и 1,0 мМ соответственно (107, 119).

Концентрация некоторых аминокислот, в частности глицина, таурина и аланина, в жидкости яйцевода и матки млекопитающих заметно выше, чем в плазме крови. В жидкости яйцевода крупного рогатого скота в наивысшей концентрации содержится глицин от 1,01 до

2,35 мМ (в среднем 1,40 мМ) и аланин от 0,24 до 0,51 мМ (в среднем 0,38 мМ) (120).

Роль аминокислот в развитии предимплантационных эмбрионов млекопитающих при культивировании была в центре внимания многих исследований. Изучали влияние на развитие эмбрионов как отдельных аминокислот, так и по группам заменимые и незаменимые аминокислоты. В последнем случае, как правило, использовали смеси незаменимых аминокислот (essential amino acids, EAA) по рецептуре среды BME (EAA BME) и смеси заменимых аминокислот (non-essential amino acids, NEAA) по рецептуре среды MEM (NEAA MEM). Развитие эмбрионов крупного рогатого скота до стадии бластоцисты улучшалось, если EAA BME и NEAA MEM одновременно добавляли к mSOF (54, 106, 121).

Потребность в аминокислотах изменяется в ходе эмбрионального развития. Включение или отсутствие аминокислот не повлияло на дробление зигот (73%), но они оказались значимыми для образования бластоцист крупного рогатого скота в среде с альбумином (106, 122, 123). По данным других авторов при добавлении к SOF в первые 72 часа культивирования глутамин и NEAA BME достоверно увеличивался выход 8-16-клеточных зародышей и бластоцист. Глутамин в отдельности не оказывал такого влияния, но его устранение снижало стимулирующее влияние NEAA. Добавление EAA MEM и глутамин к SOF с NEAA такого эффекта не давало. Культивирование после Д4 в присутствии 20 AA (NEAA+ EAA+ глутамин) увеличило развитие бластоцист, общее число клеток, число клеток в составе внутренней клеточной массы и трофэктодермы по сравнению с другими вариантами культивирования. Была выявлена отрицательная корреляция между концентрацией EAA ($x1/4$, $x1/2$ или $x1$) и развитием эмбрионов в оба периода культивирования. Это свидетельствует, что концентрация $x1$ EAA в среде велика при культивировании эмбрионов крупного рогатого скота (124). При культивировании 4-клеточных эмбрионов в среде mKSOM-PVA добавление $0,5x$ EAA, по сравнению со средой без добавления EAA, увеличило выход бластоцист (21% против 11%) и вылупление бластоцист. Увеличение уровня NEAA с $x1$ до $x5$ не улучшило развития. Увеличение концентрации только глицина или добавление 12 незаменимых аминокислот по одной или в комбинации к среде, содержащей заменимые аминокислоты, недостоверно улучшало развитие эмбрионов (125).

Полученные *in vitro* эмбрионы от зиготы до бластоцисты и полученные *in vivo* бластоцисты инкубировали в среде с включением 19 аминокислот. Глутамин в заметных количествах поглощался на стадии зиготы и 4-клеточной стадии, но недостоверно поглощался на поздних стадиях развития. Треонин был единственной аминокислотой, которая истощалась на всех стадиях развития. Аланин же был единственной аминокислотой, которая постоянно появлялась в среде и ее образование

увеличивалось с развитием зародышей. Блостоцисты потребляли достоверные количества аргинина, серина, треонина и тирозина. Напротив, концентрация глицина и аланина в среде при этом увеличивалась (126). Тем не менее при использовании беспротеиновой среды, содержащей 1 мМ глутамин, ЕАА ВМЕ и NEAA MEM добавление 5 мМ глицина и 2 или 10 мМ таурина достоверно увеличивало выход блостоцист. Среднее число клеток на блостоцисту зависело от концентрации глицина и увеличивалось при добавлении 10 мМ глицина (127).

При культивировании эмбрионов крупного рогатого скота в среде mBMOС, содержащей глутамин и NEAA MEM, также лучшие результаты были получены при дополнительном включении в среду 10 мМ глицина или 10 мМ глицина и 1 мМ аланина одновременно (120). Добавление аминокислот в концентрации, присутствующей в яйцевом овцы во время овуляции, к среде CR 2 увеличило выход блостоцист крупного рогатого скота по сравнению с добавлением аминокислот на уровне их содержания в средах MEM и ВМЕ (30,4% по сравнению с 25,2%) (128). Аминокислоты могут действовать как энергетические субстраты, регуляторы рН, или как пул аминокислот для синтеза протеинов *de novo*. Показано, что α -amanitin (ингибитор РНК-полимеразы) в концентрации 20 мкМ полностью ингибировал развитие зародышей (125).

Развитие зигот овец до блостоцисты в культуре может быть достигнуто в отсутствие углеводов в среде, содержащей заменимые аминокислоты. Блостоцисты овец могут использовать аминокислоты как ключевой источник энергии. Образование аммония блостоцистами овец составляет около 0,07рМ/клетка/час, что примерно в 7 раз выше, чем у блостоцист мыши (129), что также является косвенным свидетельством того, что аминокислоты используются в значительно большей степени эмбрионами жвачных (102). Однако без углеводного источника энергии в среде аминокислоты не обеспечивают раннее развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* (55, 103).

Была предложена двухступенчатая система культивирования. Зиготы с 18 до 72 часов от начала оплодотворения инкубировали в среде mHECM, единственным энергетическим источником в которой был лактат натрия 4,5 мМ, а потом до 192 часов от начала оплодотворения в среде 199 с сывороткой. В первый период в среду добавляли аминокислоты: 1) NEAA среды 199; 2) ЕАА среды 199; 3) NEAA+ЕАА; 4) АА среды MEM; 5) 11 АА среды HECM-6; 6) 0,2 мМ глутамин. Через 72 часа от начала оплодотворения достоверно больше было зародышей на стадии 8-16 клеток в среде с NEAA (56,7%) и с глутамином (51,1%). При последующем культивировании в среде 199 с сывороткой до стадии блостоцисты также больше всего развивалось зародышей, полученных в вариантах, включавших NEAA (52,7%) и глутамин (48,9%, считая от количества всех ооцитов). В целом, вариант добавления толь-

ко NEAA в первые 3-е суток культивирования эмбрионов был одним из лучших для последующего развития зародышей до стадии бластоцисты и вылупления. Однако глутамин был так же эффективен как и NEAA по всем контролируемым показателям, включая и вылупление бластоцист. Таким образом, глутамин может удовлетворить аминокислотную потребность эмбрионов крупного рогатого скота в первые 2-3 суток развития (130).

Механизмы, через которые глутамин оказывает благотворное влияние на развитие эмбрионов, не установлены. С одной стороны, глутамин может быть дезаминирован и использован в цикле Кребса или в образовании глюкозамино-6-фосфата, предшественника гликопротеинов, гликолипидов и других компонентов, необходимых для клеточной целостности (131). С другой стороны, если в беспротеиновой среде присутствовали 1 мМ глутамина, EAA BME, NEAA MEM и инсулин, то удаление глутамина из этой среды не влияло на развитие эмбрионов (127).

Сообщалось, что положительное влияние включения аминокислот в культуральную среду на дробление и морфологическое развитие эмбрионов мыши снижалось в процессе культивирования (129). В последующем было установлено, что аминокислоты или метаболизируются эмбрионами, или спонтанно разрушаются при 37°C с образованием существенного уровня аммония в среде (66, 132). Токсичность ионов аммония для эмбрионов мышей определяется в мкМ и ведет к патологии при последующей трансплантации (132). Эмбрионы овцы также чувствительны к накоплению аммония в среде (66, 132). Так, развитие полученных *in vivo* зигот овцы до бластоцисты в среде SOF с добавлением 20 аминокислот составляло 45% и достоверно увеличивалось до 62% при замене среды каждые 48 часов (66).

Напротив, при культивировании зародышей крупного рогатого скота наивысшие результаты (39,6% бластоцист, 27,8% вылупившихся бластоцист) были получены в микрокаплях без замены среды. Хотя концентрация аммония была на более низком уровне, если среду заменяли через 48 часов, развитие зародышей крупного рогатого скота до бластоцисты и вылупившейся бластоцисты снижалось в системе с заменой среды как в сосудах, так и в каплях (133).

Влияние альбумина и сыворотки крови на развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*. Сывороточный альбумин широко используется в культуральной среде вследствие его благотворного влияния на развитие эмбрионов за счет его ligand binding свойств, которые защищают от токсических компонентов среды (67, 134, 135). Альбумин предотвращает неспецифическое связывание эмбрионов с поверхностью пипеток и чашек Петри при работе с зародышами *in vitro*. Отличия между сериями альбумина могут быть ответственны за большие вариации при культивировании эмбрионов *in vitro* (26, 62). Однако

абсолютной необходимости в протеине для развития эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* нет (49, 136).

Среда SOF без сыворотки и соматических клеток может поддерживать развитие эмбрионов крупного рогатого скота до стадии бластоцисты. Однако замена 3,2% альбумина в оригинальной прописи среды (53) на 20% инактивированной сыворотки телят увеличивает процент эмбрионов, развившихся до стадии морулы и бластоцисты (26). Сыворотка ускоряет кинетику развития эмбрионов, увеличивает выход бластоцист и увеличивает число клеток на бластоцисту (49, 62, 64, 137, 138). Есть данные, что сыворотка стимулирует дифференциацию морул в бластоцисты (48, 139).

При использовании метода микросъемки было установлено, что ускорение развития эмбрионов, вызываемое сывороткой, происходит на стадии от 8-16 клеток до морулы, независимо от срока добавления сыворотки: 42 или 90 часов от начала оплодотворения (137). Возможно сыворотка предоставляет эмбриону незаменимые питательные вещества и ростовые факторы и может защищать эмбрионы от повреждающего влияния кислорода и тяжелых металлов. Известно, что гликопротеин LIF стимулирует развитие эмбрионов крупного рогатого скота в беспротеиновой среде. Однако LIF не улучшал показатели образования бластоцист (43%), если в среду было включено 10% эмбриональной сыворотки (140).

При культивировании полученных *in vivo* морул крупного рогатого скота для обеспечения их дальнейшего развития лучшей была сыворотка кастратов, затем новорожденных телят. Им обеим уступала эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (141). При сокультивировании полученных *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота с ЭКЯ выход морул составил 26,7, 14,6 и 1,8% при включении в среду эстральной, эмбриональной или полученной на Д2 эстрального цикла коров сыворотки, соответственно (9). Сообщалось, что некоторые серии сыворотки неэффективны или даже токсичны для эмбрионов (142).

Было показано, что сыворотка крови обладает двухфазным влиянием на развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro*: подавляет раннее и стимулирует предимплантационное эмбриональное развитие (49, 142). Влияние сыворотки на развитие эмбрионов *in vitro* от зиготы до бластоцисты не усиливается и не ингибируется нагреванием при 56°C в течение 30 минут (64). Хотя применение сыворотки затрудняет анализ факторов, влияющих на эмбриональное развитие, данная культуральная система может быть использована для получения эмбрионов крупного рогатого скота на предимплантационных стадиях развития в индустрии трансплантации эмбрионов и для биотехнологических работ.

Наряду с данными о благотворном влиянии сыворотки на развитие эмбрионов *in vitro*, имеются истораживающие сообщения. Так,

эмбрионы овцы, культивируемые в SOF с 20% сыворотки крови человека, были темнее и имели многочисленные липидоподобные включения в цитоплазму по сравнению с эмбрионами, полученными при культивировании *in vitro* в среде без сыворотки. Эти липидоподобные включения под электронным микроскопом были идентифицированы как осмофильные липидные капли. При последующей трансплантации эмбрионов средний вес ягнят при рождении был достоверно выше, если эмбрионы культивировались в SOF с сывороткой человека (4,2 кг), чем в SOF с альбумином и аминокислотами (3,5 кг) или у контрольных ягнят при естественной беременности (3,4 кг)(143).

Влияние группирования ранних эмбрионов крупного рогатого скота на их развитие in vitro. У эмбрионов крупного рогатого скота от ооцита до стадии бластоцисты имеются мРНК для TGF- α , TGF- β , PDGF, IGF I, IGF II, а так же мРНК для рецепторов IGF I, IGF II, PDGF (144). Watson et al. (144, 145) описали транскрипцию мРНК нескольких ростовых факторов и образование их рецепторов у эмбрионов овцы и крупного рогатого скота на разных стадиях развития. Некоторые из ростовых факторов способствовали улучшению развития эмбрионов крупного рогатого скота. Положительно действовали EGF, TGF- β , PDGF (67, 90, 146-148).

Развитие эмбрионов мыши *in vitro* существенно улучшалось при размещении эмбрионов группами или при снижении объема инкубационной среды (149-152). Эти данные могут свидетельствовать об образовании эмбриопроизводных факторов, которые участвуют в регуляции предимплантационного развития. Группирование эмбрионов овцы и крупного рогатого скота оказывало достоверно положительное влияние на их развитие, что подтверждает наличие аутокринной/паракринной активности (66, 153). В одной работе был получен монослой ЭКЯ на среде 199 с 10% эмбриональной сыворотки. Затем монослой сполоснули средой 199 без сыворотки и кондиционировали среду без сыворотки. Эту среду назвали «serum-poor conditioned medium», так как считали, что какие-то компоненты сыворотки могли адсорбироваться на мембране клеток, а потом диффундировать в бесывороточную среду. При плотности эмбрионов 1, 4 или 40 на каплю 40 мкл «serum-poor conditioned medium» дробление составляло 36, 50 и 59%, соответственно, до расширенной бластоцисты развивалось 0; 2,5 и 18-25% эмбрионов, соответственно. Если помещали по 1 эмбриону на каплю 5, 10 или 40 мкл, они не развивались до бластоцисты. Если оставалось постоянным соотношение 1 эмбрион/1 мкл среды, до расширенной бластоцисты развивалось 20, 17, 14 и 12% эмбрионов в каплях по 40, 30, 20 и 10 мкл, соответственно, то есть прослеживалась тенденция к улучшению развития эмбрионов с увеличением капли. Таким образом, в данной культуральной среде 1 эмбрион в капле не мог развиваться до стадии бластоцисты. Если больше 1 эмбриона помещали на кап-

лю, бластоцисты были получены, что свидетельствует о кооперативном взаимодействии между эмбрионами. Это кооперативное взаимодействие может осуществляться посредством аутокринных или паракринных факторов, секретируемых эмбрионами (154).

Стимулирующее влияние культивирования эмбрионов группами по меньшей мере частично осуществляется за счет образования platelet-derived growth factor (PDGF). PDGF оказывает воздействие как паракринный ростовой фактор (90), и улучшает созревание ооцитов и развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* в бессывороточной среде (155, 156). Культивирование эмбрионов от стадии 8 клеток до бластоцисты в группах по 40 на каплю 25 мкл увеличило образование бластоцист, процент вылупившихся бластоцист, количество клеток на бластоцисту и секрецию интерферона-tau. На основании этих данных авторы высказывают предположение, что культивирование зародышей группами может изменить экспрессию специфических генов, важных для установления беременности (157). Даже с суспензией ЭКЯ инкубировали по 15 эмбрионов в каплях 20 мкл (120), а в кондиционированной среде без сыворотки инкубировали по 40 зигот без кумулюса в каплях 40 мкл (47).

В экспериментах Donnay et al. (158) по дроблению и выходу 5-8-клеточных эмбрионов не было различий в зависимости от числа эмбрионов на каплю среды 20 мкл. Однако эмбрионы не достигали стадии бластоцисты, если они культивировались по 1 на каплю (0%), мало было получено бластоцист при культивировании по 3 и 6 эмбрионов на каплю (6%), и был хороший выход бластоцист (23%) при культивировании по 20 зародышей на каплю. Плотность 1 эмбрион/1 мкл или 1 эмбрион/3 мкл не дала достоверных различий ни по дроблению, ни по образованию и вылуплению бластоцист (62).

Haemann et al. (159) попытались разработать простую «полуопределенную» систему получения зародышей крупного рогатого скота *in vitro* при культивировании их на всех этапах от незрелых ооцитов до бластоцисты по одному, не уступающую по эффективности системам с культивированием зародышей в группах. Все ступени были проведены в каплях 10-12 мкл под маслом. Эта технология важна, если имеется ограниченное количество материала, например, при прижизненном аспирировании ооцитов, или при получении зародышей путем клонирования. Выход бластоцист в этих экспериментах составил 39%, в том числе 1 и 2 класса 26,1%.

Заключение

Разработка методов культивирования эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* с использованием соматических клеток для сокультивирования или кондиционирования среды по сравнению с культиви-

рованием эмбрионов в яйцеводах временных реципиентов явилась значительным этапом, способствовавшим повышению эффективности и упрощению всей технологии получения зародышей крупного рогатого скота *in vitro*. В свою очередь, простые солевые среды обеспечивают развитие эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* без дополнительного включения в среду соматических клеток, сыворотки крови, сывороточного альбумина. Использование простых солевых сред позволяет определять потребности эмбрионов крупного рогатого скота, обеспечивающие их развитие на предимплантационных стадиях развития. Для практических целей наиболее целесообразно использование простых солевых сред с 10-20% сыворотки крови, обеспечивающих получение наибольшего количества жизнеспособных эмбрионов крупного рогатого скота *in vitro* на стадии бластоцисты без дополнительного включения продуктов животноводства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lawson R.A.S., Rowson L.E.A., Adams C.E. The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J. Reprod. Fert.* 1972, 28: 313-315.
2. Boland M.P. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenol.* 1984; 21: 126-137.
3. Sirard M.A., Lambert R.D., Menard D.P., Bedoya M. Pregnancies resulting from *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes following their incubation in rabbit's oviduct and their transfer to the cow's uterus. *Biol. Reprod.* 1985, 32(Suppl.1): 99.
4. Sirard M.A., Lambert R.D. Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.* 1986, 119: 167-169.
5. Эрнст Л.К., Прокофьев М.И., Прокофьева Е.С., Черных В.Я., Лимонов В.И., Миршин Ю.Н., Майер П.К., Хорошилова Т.В., Захаров А.В., Поплевин В.Н., Удавленникова Н.И., Лагутина И.С. Получение телят из дозревших и оплодотворенных вне организма коровы фолликулярных ооцитов. *Вестник сельскохозяйственной науки.* 1987, 6: 82-87.
6. Wall R.J., Hawk H.W. Development of centrifuged cow zygotes cultured in rabbit oviducts. *J. Reprod. Fert.* 1987, 82: 673-680.
7. Eyestone W.H., Northey D.L., Leibfried-Rutledge M.L. Culture of 1-cell bovine embryos in the sheep oviduct. *Biol.Reprod.* 1985, 32(Suppl.1): 100.
8. Lu K.H., Gordon I., Gallagher M., Mc Govern H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *The Veterinary Record.* 1987, 121: 259-260.
9. Lu K.H., Gordon I., Chen H.B., Gallagher M., Mc Govern H. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.* 1988, 122: 539-540.
10. Gordon I., Lu K.H., Boland M.P., Crosby T.E. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro*. *Anim. Prod.* 1987, 44: 468.
11. Utsumi K., Katoh H., Iritani A. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized *in vitro*. *Theriogenol.* 1988, 29: 320.

12. Newcomb R., Christie W.B., Rowson L.E.A. Birth of calves after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro. *Veterinary Record*. 1978, 102: 461-462.
13. Xu K.P., Greve T., Callesen H., Hyttel P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1987, 81: 501-504.
14. Peuro T., Aalto J. Pregnancies resulting from bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Suomen Eläinlääkärilehti*. 1989, 95: 69-73.
15. Fukui Y., Ono H. In vitro development to blastocyst of in vitro matured and fertilized bovine oocytes. *Vet. Rec.* 1988, 122: 282.
16. Eyestone W.H., First N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.* 1989, 85: 715-720.
17. Xu K.P., Pollard J.W., Rorie R.W., Plante L., King W.A., Betteridge K.J. Pregnancy rates following transfer of bovine embryos produced by in vitro maturation, fertilization and co-culture. *Theriogenol.* 1990, 33: 351.
18. Mc Caffrey C., Mc Evoy T.G., Diskin M.G., Gwazdauskas F.C., Kane M.T., Sreenan J.M. Successful co-culture of 1-4 cell cattle ova to the morula or blastocyst stage. *J. Reprod. Fert.* 1991, 91: 119-124.
19. Mc Caffrey C., Sreenan J.M. The effect of cell to ovum contact on the development of 1-4 cell cattle ova during co-culture with oviductal cells. *Theriogenol.* 1991, 35: 239.
20. Kajihara Y., Goto K., Kosaka S., Nakanishi Y., Ogawa K. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts in vitro. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 1987, 33: 173-180.
21. Jiang H.S., Wang W.L., Lu K.H., Mc Carthy D., Gordon I. In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization comparison with in vivo culture. *J. Reprod. Fert., Abstr. Ser.* 1989, 3: 50.
22. Jiang H.S., Wang W.L., Lu K.H., Gordon I. Effects of PMSG, insulin, osmolality and estrous cow serum on development of IVM early bovine embryos cultured on granulosa cell monolayers. *Theriogenol.* 1990, 33: 258.
23. Iwasaki S., Nakahara T. Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass amounts bovine blastocysts fertilized in vitro. *Theriogenol.* 1990, 34: 683-690.
24. Iwasaki S., Nakahara T. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized in vitro followed by culture in vitro or in vivo in rabbit oviducts. *Theriogenol.* 1990, 33: 669-675.
25. Hawk H.W., Wall R.J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenol.* 1994, 41: 1571-1583.
26. Rorie R.W., Lester T.D., Miller G.F., Gliedt D.W., McNew R.W. Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenol.* 1994, 42: 385-395.
27. Lim J.M., Rocha A., Hansel W. A serum-free medium for use in a cumulus cell co-culture system for bovine embryos derived from in vitro maturation and in vitro fertilization. *Theriogenol.* 1996, 45: 1081-1089.
28. Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Koba M., Nakanishi Y., Ogawa K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in

- in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 1988, 83: 753-758.
29. Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Koba M., Nakanishi Y., Ogawa K. Pregnancies after in vitro fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in vitro and their transfer to the cow uterus. *Theriogenol.* 1988, 29: 251.
 30. Goto K., Kajihara Y., Koba M., Kosaka S., Nakanishi Y., Ogawa K. In vitro fertilization and development of in vitro matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.* 1989, 67: 2181-2185.
 31. Fukuda Y., Ichikawa M., Nato K., Toyoda Y. Normal development of bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro. 11th Int. Congr. Anim. Repr. AI, Dublin 1988, 3: 327.
 32. Fukuda Y., Ichikawa M., Nato K., Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.* 1990, 42: 114-119.
 33. Camous S., Heyman Y., Menezo Y. In vitro culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicles: cleavage through the block stage, followed by pregnancy after transfer. *Theriogenol.* 1984, 21: 226.
 34. Heyman Y., Menezo Y. Interaction of trophoblastic vesicles with bovine embryos developing in vitro. In: *The Mammalian Preimplantation Embryo. Regulation of Growth and Differentiation in Vitro.* Ed. B.D.Bavister. New York : Plenum Press; 1987: 175-191.
 35. Heyman Y., Menezo Y., Chesne P., Camous S., Garnier V. In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenol.* 1987, 27: 59-68.
 36. Wang W.L., Jiang H.S., Lu K.H., Gordon I. Effect of condition medium and glucose concentration on the in vitro development of early bovine embryos. *Theriogenol.* 1990, 33: 343.
 37. Eyestone W.H., Jones J.M., First N.L. The use of oviduct-conditioned medium for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenol.* 1990, 33: 226.
 38. Thomas W.K., Seidel G.E. Effects of cumulus cells on culture of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Anim. Sci.* 1993, 71: 2506-2510.
 39. Mermillod P., Mourmeaux J.L., Wils C., Massip A., Dessy F. Protein free oviduct conditioned medium for complete bovine embryo development. *Vet. Rec.* 1992, 130: 13.
 40. Mermillod P., Van Steenbrugge A., Wils C., Mourmeaux J.L., Massip A., Dessy F. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol. Reprod.* 1993, 49: 582-587.
 41. Mermillod P., Van Steenbrugge A., Wils C., Massip A., Dessy F. Study of the bovine embryotrophic activity of serum free oviduct conditioned medium. *Theriogenol.* 1993, 39: 267.
 42. Grisart B., Massip A., Collette L., Dessy F. The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. *Theriogenol.* 1995, 43: 1097-1106.

43. Stojkovic M., Zakhartchenko N., Brem G., Wolf E. Support for the development of bovine embryos in vitro by secretions of bovine trophoblastic vesicles derived in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1997, 111: 191-196.
44. Van Langendonck A., Vansteenbrugge A., Donnay I., Van Soom A., Berg U., Semple E., Grisart B., Mermillod P., Brem G., Massip A., Dessy F. Three year results of in vitro production of bovine embryos in serum-poor bovine oviduct conditioned medium. An overview. *Reprod. Nutr. Dev.* 1996, 36: 493-502.
45. Scodras J.M., Pollard J.W., Plante ., Betteridge K.J. Establishment of a bovine trophoblast cell line supporting the development of in vitro matured and fertilized oocytes. *Biol. Reprod.* 1990, 42(Suppl.1): 167.
46. Smith A.G., Hooper M.L. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 1987, 121: 1-9.
47. Vansteenbrugge A., Van Langendonck A., Scutenaire C., Massip A., Dessy F. In vitro development of bovine embryos in buffalo rat liver- or bovine oviduct-conditioned medium. *Theriogenol.* 1994, 42: 931-940.
48. Pinyopummintr T., Bavister B.D. In vitro matured /in vitro fertilized bovine oocytes can develop into morulae/ blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol. Reprod.* 1991, 45: 736-742.
49. Bavister B.D., Rose-Hellekant T.A., Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenol.* 1992, 37: 127-146.
50. Thibodeaux J.K., Del Vecchino R.P., Hansel W. Role of platelet-derived growth factor in development of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 1993, 98: 61-66.
51. Thompson J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenol.* 1996, 45: 27-40.
52. Avery B., Greve T. Impact of incubator type on the yield of in vitro produced bovine blastocysts. *Acta Vet. Scand.* 1992, 33: 341-348.
53. Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E.A. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.* 1972, 30: 493-497.
54. Rosencrans C.F., First N.L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J. Anim. Sci.* 1994, 72: 434-437.
55. Kim J.H., Niwa K., Lim J.M., Okuda K. Effects of phosphate, energy substrates and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* 1993, 48:1320-1325.
56. Takagi Y., Mori K., Tomizawa M., Takahashi T., Sugawara S., Masaki J. Development of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in a serum-free, chemically defined medium. *Theriogenol.* 1991, 35: 1197-1207.
57. Lonergan P., Carolan C., Mermillod P. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reprod. Nutr. Dev.* 1994, 34: 329-339.
58. Mc Laughlin K.J., Mc Lean D.M., Stevens G., Ashman R.J., Lewis P.A., Bartsch B.D., Seamark R.F. Viability of one-cell bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenol.* 1990, 33: 1191-1199.

59. Walker S.K., Lampe R.J., Seamark R.F. Culture of sheep zygotes in synthetic oviduct fluid medium with different concentrations of sodium bicarbonate and HEPES. *Theriogenol.* 1989, 32: 797-804.
60. Mc Laughlin K.J., Ashman R.J., Mc Lean D.M., Stevens G., Bartsch B.D., Seamark R.F. Viability of one cell bovine embryos cultured in synthetic oviduct fluid medium. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 1989, 21: 36.
61. Fukui Y., McGowan L.T., James R.W., Pugh P.A., Tervit H.R. Factors affecting the in vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1991, 92: 125-131.
62. Carolan C., Lonergan P., Van Langendonck A., Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenol.* 1995, 43: 1115-1128.
63. Massip A., Mermillod P., Van Langendonck A., Reichenbach N.D., Lonergan P., Berg U., Carolan C., De Roover R., Brem G. Calving outcome following transfer of embryos produced in vitro in different conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 44: 1-10.
64. Lim J.M., Okutsu O., Okuda K., Niwa K. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenol.* 1994, 41: 1091-1098.
65. Lim J.M., Kim J.H., Okuda K., Niwa K. The importance of NaCl concentration in a chemically defined medium for the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenol.* 1994, 42: 421-432.
66. Gardner D.K., Lane M., Spitzer A., Batt P.A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.* 1994, 50: 390-400.
67. Thompson J.G., Partridge R.J., Houghton F.D., Cox C.I., Leese H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 1996, 106: 299-306.
68. Liu Z., Foote R.H. Sodium chloride, osmolyte, and omolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos, produced by in vitro fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media. *J. Assisted Reprod. Genetics.* 1996, 13: 562-568.
69. Schini S.A., Bavister B.D. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.* 1988, 39: 1183-1192.
70. Bishop D.W. Oxygen concentration in the rabbit genital tract. In: *Proc. Third Internat. Congr. Anim. Reprod. Physiol.* Ed.: D.W. Bishop. London: Brown, Knight and Truscott Ltd. 1956: 53-58.
71. Yochim J.M., Mitchell J.A. Intrauterine oxygen tension in the rat during proestation: Its possible relation to carbohydrate metabolism and the regulation of oxidation. *Endocrinology.* 1968, 83: 706-713.
72. Mastroianni L., Jones R. Oxygen tension within the rabbit tube. *J. Reprod. Fert.* 1965, 9: 99-102.
73. Fischer B., Bavister B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamster and rabbits. *J. Reprod. Fert.* 1993, 99: 673-679.

74. Maas D.H.A., Storey B.T., Mastroianni I. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey. *Fertil. Steril.* 1976, 27: 1312-1317.
75. Brown B.W., Fraser I.S., Mattner P.E. Capillary blood flow in the endometrium and myometrium of conscious sheep: Effect of catheterization of uterine arteries. *Aust. J. Biol. Sci.* 1985, 38: 209-214.
76. Leese H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum. Reprod. Update.* 1995, 1: 63-72.
77. Yang B.K., Yang X., Foote R.H. Early development of IVM/IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO₂ and O₂. *J. Reprod. Dev.* 1994, 40: 197-205.
78. Nakao H., Nakatsuji N. Effects of co-culture, medium components, and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenol.* 1990, 33: 591-600.
79. Voelkel S.H., Hu I.X. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenol.* 1992, 37: 1117-1131.
80. Takahashi Y., Hishinuma M., Matsui M., Tanaka H., Kanagawa H. Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *J. Vet. Med. Sci.* 1996, 58: 897-902.
81. Fower C.J., Callingham B.A. Substrate selective activation of rat liver mitochondrial monoamine oxidase by oxygen. *Biochem. Pharm.* 1978, 27: 1995-2000.
82. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1989.
83. Legge M., Sellens M.H. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum. Reprod.* 1991, 6: 867-871.
84. Rieger D., Loskutoff N.M., Betteridge K.J. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod. Fert. Dev.* 1992, 4: 547-557.
85. Johnson M.H., Nasr-Esfahani M.H. Radical solutions and culture problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioassays.* 1994, 16: 31-38.
86. Nasr-Esfahani M.H., Aitken J.R., Johnson M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development.* 1990, 109: 501-507.
87. Noda Y., Matsumoto H., Umaoka Y., Tatsumi K., Kishi J., Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 28: 356-360.
88. Goto Y., Noda Y., Mori T., Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured in vitro. *Free Rad. Biol. Med.* 1993, 15: 69-75.
89. Nagao Y., Saeki K., Hoshi M., Kainuma H. Effect of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of in vitro matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenol.* 1994, 41: 681-687.

90. Thibodeaux J.K., Myers M.W., Hansel W. The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. *Theriogenol.* 1995, 43: 336.
91. Watson A.J., Watson P.H., Warnes D., Walker S.K., Armstrong D.T., Seamark R.F. Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmospheres. *Biol. Reprod.* 1994, 50: 715-724.
92. Meizel S., Liu C.W., Working P.K., Mrsny R.J. Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluid of several mammals. *Dev. Growth Differ.* 1980, 22: 483-494.
93. Fujitani Y., Kasai K., Ohtanis S., Nishimura K., Yamada M., Utsumi K. Effect of oxygen concentrations and free radicals on in vitro development of in vitro produced bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 1997, 75: 483-489.
94. Peters R.M., Reed M.L. Addition of taurine and hypotaurine to culture medium improves development of one- and two-cell pig embryos in vitro. *Theriogenol.* 1991, 35: 253.
95. Liu Z., Foote R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.* 1995, 53: 786-790.
96. Harvey M.B., Arcellana-Panlilio M.Y., Zhang X., Schultz G.A., Watson A.J. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol. Reprod.* 1995, 53: 532-540.
97. Bavister B.D. Role of oviductal secretion in embryonic growth in vivo or in vitro. *Theriogenol.* 1988, 29: 143-154.
98. Thompson J.G., Simpson A.G., Pugh P.A., Donnelly P.E., Tervit H.R. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fert.* 1990, 89: 573-578.
99. Gutteridge J.M.C. A method for removal of trace iron contamination from biological buffers. *FEBS Lett.* 1987, 214: 362-364.
100. Chatot C.L., Ziomek C.A., Bavister B.D., Lewis J.L., Torres J. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1989, 86: 679-688.
101. Chatot C.L., Lewis J.L., Torres J., Ziomek C.A. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.* 1990, 42: 432-440.
102. Thompson J.G., Simpson A.G., Pugh P.A., Tervit H.R. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1992, 31: 253-257.
103. Pinyopummintr T., Bavister B.D. Energy substrate requirements for in vitro development of early cleavage-stage bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1996, 44: 193-199.
104. Ellington J.E., Farrell P.B., Carney E.W., Simkin M.E., Foote R.H. In vitro developmental potential of bovine zygotes in oviduct epithelial cell co-culture systems. *Theriogenol.* 1990, 33: 223.

105. Ellington J.E., Farrell P.B., Simkin M.E., Goldman E.E., Foote R.H. Bovine zygote development in oviduct cell coculture versus rabbit oviducts. *Theriogenol.* 1990, 33: 224.
106. Takahashi Y., First N.L. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids, and vitamins. *Theriogenol.* 1992, 37: 963-978.
107. Rosencrans C.F., Leng G.Q., Mc Namara G.T., Schoff P.K., First N.L. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 1993, 49: 459-462.
108. Jong-Heung K., Niwa K., Jeong-Mook L., Okuda K. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro matured, in vitro fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* 1993, 48: 1320-1325.
109. Lim J.M., Kim J.H., Okuda K., Niwa K. Effect of the presence of glucose during fertilization and/or culture in a chemically semi-defined medium on the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Dev.* 1993,39: 237-242.
110. Furnus C.C., De Matos D.G., Martinez A.G., Matkovic M. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenol.* 1997, 47: 481-490.
111. Javed M.H., Wright R.W. Determination of pentose phosphate and emben-meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenol.* 1991, 35: 1029-1037.
112. Renard J.P., Philippon A., Menezo Y. In vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 1980, 58: 161-164.
113. Robl J.M., Dobrinsky J.R., DUBY R.T. The effect of protein supplements on the in vitro development of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenol.* 1991, 35: 263.
114. Tiffin G.J., Rieger D., Betteridge K.J., Yadav B.R., King W.A. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J. Reprod. Fert.* 1991, 93: 125-132.
115. Kim J.H., Funahashi H., Niwa K., Okuda K. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. *Theriogenol.* 1993, 39: 875-886.
116. Ohboshi S., Hanada K., Zhao J., Hattori M., Fujihara N., Umetsu R., Yoshida T., Tomogane H. In vitro development of bovine one-cell embryos fertilized in vitro in serum- and feeder cell-free culture systems. *Asian-Australian J. Anim. Sci.* 1996, 9: 583-590.
117. Matsuyama K., Miyakoshi H., Fukui Y. Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenol.* 1993, 40: 595- 605.
118. Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., First N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol. Reprod.* 1989;41:683-699.
119. Takahashi Y., First N.L. In vitro culture of bovine one-cell embryos fertilized in vitro using synthetic oviduct fluid medium with and without glucose and supplemented with fetal calf serum. *Anim. Reprod. Sci.* 1993, 31: 33-47.

120. Moore K., Bondioli K.R. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of in vitro matured and fertilized cattle embryos. *Biol. Reprod.* 1993, 48: 833-840.
121. Naqvi S.M.K., Mc Gown L.T., Thompson J.G., Tervit H.R. Effect of amino acid supplementation in culture media on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Indian J. Anim. Sci.* 1996, 66: 457-460.
122. Rosencrans C.F., First N.L. Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: Effects of amino acids and vitamins. *Theriogenol.* 1991, 35: 266.
123. Sharif H., Monaghan P., Gordon I. Influence of amino acids and vitamins on the development of early bovine embryos in the isolated mouse oviduct system. *Theriogenol.* 1993, 39: 308.
124. Steeves T.E., Gardner D.K. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 1999, 61: 731-740.
125. Liu Z., Foote R.H. Effects of amino-acids and alpha-amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. *Mol. Repr. Dev.* 1997, 46: 278-285.
126. Partridge R.J., Leese H.J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reprod. Fert. Dev.* 1996a, 8: 945-950.
127. Takahashi Y., Kanagawa H. Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of in vitro fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. *J. Vet. Med. Sci.* 1998, 60: 433-437.
128. Hill J.L., Wade M.G., Nancarrow C.D., Kelleher D.L., Boland M.P. Influence of ovine oviductal amino acid concentrations and ovine estrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 47: 164-169.
129. Gardner D.K., Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol. Reprod.* 1993, 48: 377-385.
130. Pinyopummintr T., Bavister B.D. Effect of amino acids on development in vitro of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. *Reprod. Fert. Dev.* 1996, 8: 835-841.
131. Zielke H.R., Zielke C.L., Ozand P.T. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Federation Proc.* 1984, 43: 121-125.
132. Gardner D.K. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol. Int.* 1994, 18: 1163-1179.
133. Fukui Y., Lee E.S., Araki N. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. *J. Anim. Sci.* 1996, 74: 2752-2758.
134. Flood L.P., Shirley B. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 1991, 30: 226-231.
135. Kane M.T. In vitro growth of preimplantation rabbit embryos. In: *The Mammalian Preimplantation Embryo. Regulation of growth and differentiation in vitro.* Ed.: Bavisster B.D. Plenum Press, 1987: 193-219.
136. Seidel G.E., Glass T., Olson S.E. Culture of 1-cell bovine embryos to blastocysts in chemically defined media. *Biol. Reprod.* 1991, 44(Suppl.1): 155.
137. Van Langendonck A., Donnay I., Schuurbiens N., Auquier P., Carolan C., Massip A., Dessi F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. Fert.* 1997, 109: 87-93.

138. Yoshioka K., Othman A.M., Taniguchi T., Yamanaka H., Sekikawa K. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenol.* 1997, 48: 997-1006.
139. Wang S., Liu Y., Holyoak G.R., Bunch T.D. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M 199 media. *Anim. Reprod. Sci.* 1997, 48: 37-45.
140. Funston R.N., Nauta W.J., Seidel G.E. Culture of bovine embryos in buffalo rat liver cell-conditioned media or with leukemia inhibitory factor. *J. Anim. Sci.* 1997, 75: 1332-1336.
141. Allen R.L., Bondioli K.R., Wright R.W. The ability of fetal calf serum, new-born calf serum and normal steel serum to promote in vitro development of bovine morulae. *Theriogenol.* 1982, 18: 185-189.
142. Pinyopummintr T., Bavister B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenol.* 1994, 41: 1241-1249.
143. Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., Mc Millan W.H., Tervit H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol. Reprod.* 1995, 53: 1385-1391.
144. Watson A.J., Hogan A., Hahnel A., Wiemer K.E., Schultz J.A. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 1992, 31: 87-95.
145. Watson A.J., Watson P.H., Arcellana-Panlilio M., Warnes D., Walker S.K., Schultz G.A. Armstrong D.T., Seamark R.F. A growth factor map for ovine preimplantation development. *Biol. Reprod.* 1994, 50: 725-733.
146. Flood M.R., Gage T.L., Bunch T.D. Effect of various growth-promoting factors on pre-implantation bovine embryos development in vitro. *Theriogenol.* 1993, 39: 823-833.
147. Larson R.C., Ignatz G.G., Currie W.B. Transforming growth factor- β and basic fibroblast growth factor synergistically promote early bovine embryo development during the fourth cell cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 1992, 33: 432-435.
148. Larson R.C., Ignatz G.G., Currie W.B. Plateled derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. *Development.* 1992, 115: 821-826.
149. Wiley L.M., Yamamis S., Van Muyden D. Effect of potassium concentration, type of protein supplement and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil. Steril.* 1986, 45: 111-119.
150. Paria B.C., Dey S.K. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of preimplantation mouse embryos in vitro. *Hum. Reprod.* 1992, 7: 558-562.
151. Lane M., Gardner D.K. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of preimplantation mouse embryos in vitro. *Hum. Reprod.* 1992, 7: 558-562.
152. Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И., Татарина Л.В., Рябых В.П. Развитие мышиных эмбрионов in vitro в среде без белка в зависимости от количества зародышей в микрокапле среды. *Онтогенез*, 1993, 24(6): 53-60.

153. Keefer C.L., Stice S.L., Paprocki A.M., Golueke P. In vitro culture of bovine IVM/IVF embryos: Cooperative interaction among embryos and the role of growth factor. *Theriogenol.* 1994, 41: 1323-1331.
154. Ferry L., Mermillod P., Massip A., Dessy F. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenol.* 1994, 42: 445-453.
155. Eckert J. Investigations on the importance of platelet-derived growth factor (PDGF) on the in vitro production of cattle embryos from cumulus-oocyte complexes of different morphological quality. *Inst. Tierzucht und Tierverhalten in Mariensee. Germany.* 1994.
156. Eckert J., Niemann H. Effects of platelet-derived growth factor (PDGF) on the in vitro production of bovine embryos in protein-free media. *Theriogenol.* 1996, 46: 307-320.
157. Larsom M.A., Kubisch H.M. The effects of group size on development and interferon-tau secretion by in vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. *Hum. Reprod.* 1999, 14: 2075-2079.
158. Donnay I., Van Langendonck A., Auquier P., Grisart B., Vansteenbrugge A., Massip A., Dessy F. Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenol.* 1997, 47: 1549-1561.
159. Hagemann L.J., Weilert L.L., Beaumont S.E., Tervit H.R. Development of bovine embryos in single in vitro production (SINP) systems. *Mol. Reprod. Dev.* 1998, 51: 143-147.

ОЦЕНКА ВИДОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ Y 07736 (1.1), X 81898 (1.3) И Y 07735 (42.3)

В.Н. Симоненко, Н.П. Корохов, В.Г. Шевченко
Лаборатория молекулярной биологии

Проведен анализ видовой специфичности микросателлитных последовательностей (TG)_n типа, выделенных из космидной геномной библиотеки быка и зарегистрированных в Европейском институте биоинформации под номерами Y 07736, X 81898 и Y 07735. Для амплификационного анализа микросателлитных локусов подобраны пары праймеров и температура отжига. При определении уровня гомологии между соответствующими локусами быка и барана проведено секвенирование фрагмента генома барана, предварительно амплифицированного в препаративных количествах при использовании бычьих праймеров. Из числа проанализированных только локус Y 07736 оказался видоспецифичным. В случае локуса X 81898 гомология с аналогичным фрагментом генома барана составила 92,8%, а для локуса Y 07735 – 82%.

Введение

Основополагающей проблемой генетики крупного рогатого скота является выявление генов, определяющих формирование хозяйственно полезных признаков, и установление механизмов реализации их информации. Одним из подходов к решению этой проблемы является позиционное картирование, использующее маркерные последовательности, равномерно представленные на всех хромосомах, для выявления корреляции их наследования с определенными признаками и последующее определение генов, непосредственно детерминирующих признак. Выбор такого подхода обусловлен тем, что высшие организмы имеют не только большее количество генов, чем простые, но и более сложную сеть взаимоотношений. В этом случае выбор позиционного картирования становится очевидным, поскольку он дает возможность одновременно оценивать состояние многих элементов генома (3). Для успешной реализации позиционного картирования обязательным условием является наличие детализированных генетических карт и легко детектируемых полиморфных маркеров с кодоминантным типом наследования. Появление микросателлитных последовательностей и развитие технологий по их выявлению придали новый импульс как созданию насыщенных маркерами генетических карт, так и развитию позиционного картирования.

Самая подробная генетическая карта крупного рогатого скота построена при помощи 1236 полиморфных ДНК-маркеров, 14 эритроцитарных антигенов и сывороточных белков со средним расстоянием между маркерами 2,5 сМ (8). Однако, несмотря на достигнутое четырехкратное увеличение плотности маркеров на упомянутой карте, 14% генетических интервалов на ней имеют длину больше максимально допустимого для достоверного определения сцепления локусов (10 сМ). Поэтому проблема насыщения карт генетическими маркерами все еще остается актуальной.

В связи с этим ранее была проведена работа по выделению из космидной геномной библиотеки быка микросателлитных последовательностей (TG)_n типа, как наиболее многочисленных и составляющих в среднем 57% от общего числа микросателлитных повторов в геноме млекопитающих (4). В этих исследованиях были выделены (TG)_n содержащие последовательности из хромосомспецифичных космид: два фрагмента (1.1 и 1.3) из космиды № 1, которая гибридизовалась с 14, 20, 22 и 29 хромосомами и фрагмент (42.3) из космиды 42, локализованной на Y-хромосоме. После секвенирования и определения нуклеотидных последовательностей локусы были зарегистрированы в Европейском институте биоинформации под номерами: локус 1.1 – Y 07736 ; 1.3 – X 81898 ; 42.3 – Y 07735.

Для дальнейшего их использования в работах по генотипированию животных необходимо было оценить видовую специфичность выделенных последовательностей, что и явилось задачей данного сообщения.

Материал и методы

В работе были использованы образцы крови и спермы крупного рогатого скота черно-пестрой породы, коз, овец, кроликов и человека. Выделение ДНК из биологических образцов проводили фенольно-детергентным методом. В экспериментах использованы методы, описанные в лабораторных руководствах по молекулярному клонированию (2).

Амплификационный анализ. Для направленной амплификации интересующих микросателлитных локусов были подобраны пары праймеров с помощью компьютерной программы PC/Gene (Sutelli Genomes Inc., Switzerland). При подборе пар праймеров одним из задаваемых условий было максимально допустимое уменьшение размера амплифицируемого фрагмента. Подобное ограничение связано с малым размером единицы повтора (2 п.о.), что при большом размере фрагмента не может позволить выявить различия между фрагментами, отличающимися на два нуклеотидных остатка.

Для оценки видоспецифичности амплифицируемых локусов использовали образцы ДНК, выделенные из биопроб указанных выше животных и человека. Реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 8,4; 50мМ КСl; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% желатина, четыре дНТФ в концентрации 200 мМ каждого, 1-2 мкКи α -³³P дАТФ (5000 Ки/ ммоль), два подобранных праймера в концентрации 0,25-0,5 мМ; 5-10 нг ДНК и 2,5 е.а. Tag ДНК полимеразы, соблюдая следующий температурный режим: 94°C – 0,7 мин, 55° – 58°C – 0,7 мин и 72°C – 1 мин (27 циклов). По завершении амплификации к образцам добавляли 5 мкл раствора, содержащего 10 мМ NaOH; 90% формамида; 0,05% бромфенолового синего; 0,05% ксиленцианола. Полученную смесь прогревали в течение 2 мин при 70° С и по 3 мкл наносили на секвенирующий 5% полиакриламидный гель толщиной 0,35 мм (состав раствора, используемого для приготовления геля – 7М мочевины, 5% акриламид, 0,25% бисакриламид). Электрофорез проводили в аппарате «Poker Face» (Hoefler Scientific Instruments, USA) со стабилизацией по мощности 80 Вт – до выхода ксиленцианола из геля. После электрофореза иммобилизованный на одном стекле гель помещали на 20 мин в раствор 10% уксусной кислоты, ополаскивали водой, сушили и экспонировали с рентгеновской пленкой 18-24 ч при комнатной температуре.

Определение нуклеотидной последовательности исследуемых микросателлитных локусов. Нуклеотидную последовательность опре-

деляли методом секвенирования с использованием терминаторов полимеразной реакции. Для этого использовали набор для секвенирования fmol ДНК Cycle Sequencing System (Promega, USA). Реакцию проводили в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. По завершении последнего цикла образцы выдерживали дополнительно 5 мин при 72°C. В каждую пробирку вносили по 4 мкл «стоп»-раствора. Перед нанесением на гель образцы денатурировали при 80°C.

Полученные продукты анализировали в секвенирующем геле толщиной 0,35 мм следующего состава: 5% акриламид, 1х ТБЕ, pH 8,3; 7 М мочевины, соотношение акриламид/бисакриламид – 20: 1. Электрофорез проводили в аппарате «Poker Face» (Hoefler Scientific Instruments, USA) со стабилизацией по мощности 80 Вт. По окончании электрофореза гель вымачивали 20 мин в 10% уксусной кислоте, промывали дистиллированной водой и сушили. Экспонировали в течение суток с рентгеновской пленкой.

Результаты и обсуждение

При исследовании базы данных последовательностей было выявлено, что локализация микросателлитных локусов среди млекопитающих часто бывает консервативной (9, 10). Это позволяет реципрокно использовать пары праймеров, подобранные для анализа микросателлитов у близкородственных видов. В связи с этим была проведена оценка видовой специфичности исследуемых микросателлитных локусов крупного рогатого скота, овцы, козы, кролика и человека с помощью праймеров, подобранных для амплификации локусов генома крупного рогатого скота.

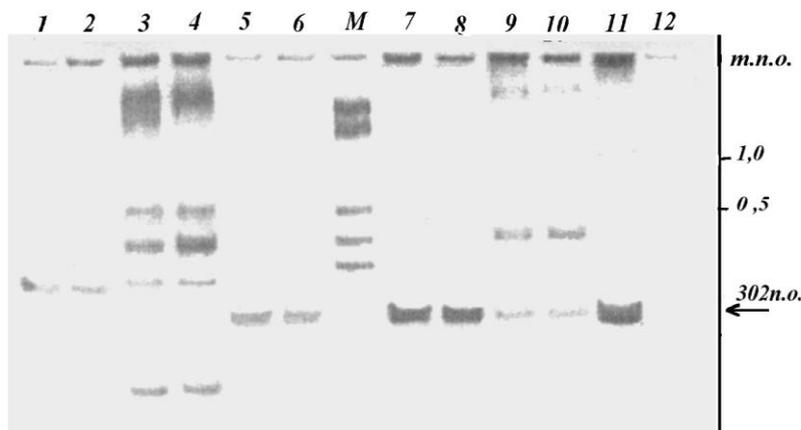
При амплификации микросателлитной последовательности локуса 1.1 быка продукт образовывался как при температуре отжига 58°C, так и при температуре 55°C. При использовании образцов ДНК козы, овцы, кролика и человека, вне зависимости от температуры отжига, синтез не шел. Полученные результаты позволяют сделать вывод об уникальности данной последовательности для крупного рогатого скота, хотя результаты FISH проб космиды №1 с хромосомами козы и овцы показали наличие последовательностей, гомологичных бычьим в прицентромерных районах 3-5 аутосомных пар этих животных (4).

При исследовании видовой специфичности микросателлитной последовательности локуса 1.3 продукт размером 302 п.о. также образовывался для крупного рогатого скота как при температуре отжига 58 °C, так и при 55°C. Приблизительно такого же размера ампликат в этих условиях получали и в случае использования в качестве матрицы ДНК барана. При температуре отжига 58°C в случаях использования в качестве матрицы ДНК кролика, козы и человека амплификация не шла, а при 55°C синтезировались продукты, имеющие другие размеры.

При использовании ДНК козла синтезировалось два фрагмента, размер одного из них был сходен с размером фрагментов быка и барана, что свидетельствует, по-видимому, о довольно высокой гомологии исследуемого участка генома козла, быка и барана (рис. 1).

Рис. 1. Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК с праймерами для локуса 1.3. при температуре отжига 55⁰С. 1, 2 - кролик; 3, 4 - человек; 5, 6 - баран; 7, 8 - бык; 9, 10 - козел; 11 - рUC18+1.3; 12 - 0.

В этом случае результаты амплификации подтверждают результаты гибридизации *in situ*, демонстрирующие наличие в геноме барана и козла последовательностей, гомологичных находящимся в составе



космиды №1 (4).

В связи с этим, для определения уровня гомологии между соответствующими последовательностями быка и барана, было проведено секвенирование фрагмента генома барана, предварительно амплифицированного в препаративном количестве при использовании бычьих праймеров. Сравнительный анализ первичной структуры исследуемых микросателлитных последовательностей локуса 1.3 быка и барана был проведен с помощью компьютерной программы PC/Gene (IntelliGenetics Inc., Switzerland). Гомология между исследуемыми последовательностями быка и барана локуса 1.3 составила 92,8%. Было установлено, что секвенированная последовательность генома барана содержит совершенный повтор, образованный семнадцатью динуклеотидами TG (рис. 2), в то время как соответствующая последовательность генома быка состоит из четырнадцати динуклеотидов TG и одного динуклеотида СТ.

1- GATCCCTGGGTCCGGAAGATGCCTCCAGTAGAAGGAAATGGCAACCCACT -50
 1 -CCAGTATCCTCGCCTGGGAAATGCCACGAACAGAGGAGCCTGATGGGCCG-100

```

1 - AGTCCATGGGTCGTATCAAGTTGGGCTCAATCCAGCAACTACGAACAGA -150
2 - ----- TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT -33
                ***** *

1 - AGTAATTCCAAAGACCACACTCAAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCT -200
2 - GTATCTCCTCTTGCCGCTTGGAGTCTGTCTCGGAATCTTCATGTATTTC -83
    *****

1 - GTATCTCCTCTTGCCGCTTGGAGTCTGTCTCGGAATCTTCATGTATTTC -250
2 - TGCCTCTGTATCTCCTGACAGCCAGCCGCCCGCCGTTTCGTCTTGGCCCC -133
    *****

1 - TGCCTCTGTATCTCCTGACAGCCATCCGCCGGCGC-TTCGTCTGG---CC -296
2 - CGGCCTCTCCAGGGCGCTCTGGCTCTGGCTAAGGA-CTTGCGCAGGCCAG -182
    *****

1 - CGGCCTCTCC-AGGCGCTCTGGTTCTGGCTGAGGAGCTTGCGCAGGCCAG -345
2 - CTGTCTCCCTTGGCGTGGGTGCGTGCGAGTGTCTGTGTTTCTGTCTGTGT -232
    *****

1 - CTGTCTCCCTTGGCGTGGGTGCGTGCGAGTGTCTGTGTGTCTGTCTGTGT -395
2 - GCCT -236
    ****

1 - GCCTGCCTGTGGGCTCGTCTGCTCTCTCAGGAAAGGTTCGAGGGCTTGGCGTG -445
2-GGGGCAAAGGGGGGGCCTCGGTAGTGCGAAGGGGAGGGGCTGAGCGCTCC-495
1 - GCTCGACCGCGCCTTCCTGGCTTCTGGTGGGTTTGGGCACCGCACAGGTG -545
1 - CCGCGCCAGTTGGGCGCTCAAGTTTCGCTGCACCTAGGCCCGCAGGAGGT -595
1 - TCAGAGGCCCTGGGCCGCGGGGTTGGGAGCGCGGGCGCCGAAGACCGA-645
1 - CACCTCCGGGGCCGCGGGGCTGAGCAGCGCATGGGATC -685

```

*Рис. 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей локуса 1.3 быка и барана. 1 - нуклеотидные последовательности быка; 2 - нуклеотидные последовательности барана; * - используется для обозначения совпадающих нуклеотидов; микросателлитные повторы быка и барана выделены; праймеры подчеркнуты.*

При оценке видовой специфичности локуса 42.3 амплификат размером 113 п.о. синтезировался при температурах отжига 55°C и 58°C при использовании в качестве матрицы ДНК быка. Во всех остальных случаях синтез при температуре отжига 58°C не шел; при температуре отжига 55°C продукт такого же размера синтезировался в случае использования ДНК барана, а в случае использования образцов ДНК козла и человека синтезировались фрагменты других размеров (шел неспецифичный синтез) (рис. 3).

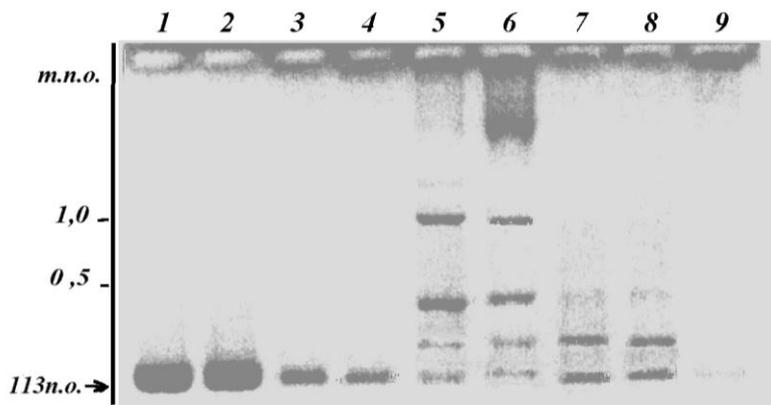


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК с праймерами для локуса 42.3 при температуре отжига 55⁰С. 1, 2 - бык; 3, 4 - баран; 5, 6 - человек; 7, 8 – козел, 9 - 0.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой гомологии данного локуса Y-хромосомы у быка, барана и, по-видимому, козла. Исследуемый локус интересен для изучения структурных различий и эволюции Y-хромосом у представителей семейства Bovidae.

Так же как и в предыдущем случае, был проведен сравнительный анализ первичной структуры исследуемых микросателлитных последовательностей локуса 42.3 быка и барана (рис. 4). По результатам анализа гомология для последовательностей локуса 42.3 из генома быка и барана составила 82%. Соответствующая микросателлитная последовательность барана короче – она образована одиннадцатью динуклеотидами (TG), одним (CA) и одним (CT) – (TG)₂(CA)((TG)₂(CT)(TG)₅(TA)(TG)₂. Существенно меньший размер аллелей для гомологичных локусов в геноме овцы, анализируемых при помощи праймеров, подобранных для крупного рогатого скота, отмечают также Gortari и соавт. (7).

```

1-GGGTGCTTTAGGTCAAGGAGCCATTCAGGCCACATGCTCGTCCAGAATAT -50
1-CCAATAGCAACAGCCCTAGTCTTGGTTGGAAGAAGCACACTGGAACAGAG -100
1-TTCCAAGGATGCTGGGTACTTCCACATGCCAGCCAGCACTGATGTGCT -150
1-CAGGTCTGCCATACCATCACACAAGTCATGGCTCCATGTTCCCTGTGG -200
1 - TGTCTGCATCTGAGGTGGTCTGTATCCCCTAACCAGGGGCTGTTTCTCA -250
1 - CAGCTACTGTACTCCTGACTTGTGTGTGCTGGCAATTGTCATGTCACTGC -300
2 - -----GTTGCACACTGTGTCTTCAAGCA -23
*****
1 - TTACCTGGTCAGGATTTAGCTGTCCCTGTTGCACACTGTGTCTTCAAGCA -350
2 - AGGGGGTGGTGTGCATGTGTATGTGTGTGTGTATGTGT----- -61
*****
1 - AGGGGGTGGTGTGCATGTGTATATGTGTGTGTGTGTGTGTCTGTGTGTGT -400

```

```

2 - CTTCAGCAAGATAGCCCTAGGTCTCTGACCTGTTCCCTGT -101
***** * **** *****
1-CTTCAGCAAGAAAACCCCTGGGTCTCTGACCTGTTCCCTGTCTTCACAACG -450
1-GATGGCAGGCATGTGTCTGAATTCGTCTGGCACTCAGAGGAGATGAGAAC -500
1 - AGCAGCCCTTCCAGTTCACCTTGCTTGTGGGCCACCTCATGCCTTTGC -550
1 - ACTGCTCTAGTGAGTGCAACTACAGTGAGTCTGACTGATGGGTATGGGTC -600
1 - TTGGGACTCCCGCT -614

```

*Рис. 4. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей локуса 42.3 быка и барана. 1 - нуклеотидные последовательности быка; 2 - нуклеотидные последовательности барана; *- используется для обозначения совпадающих нуклеотидов; микросателлитные последовательности быка и барана выделены.*

Заключение

Изучение локализации генов в геноме крупного рогатого скота, овец и коз показало, что несмотря на отсутствие очевидной цитогенетической гомологии, в процессе эволюции геномы этих видов сохранили достаточно высокую гомологию (5, 11). Значительная консервативность микросателлитных локусов геномов крупного рогатого скота, овец и коз подтверждает это предположение (12, 13). Поэтому большая часть микросателлитов, которые используются при картировании генома крупного рогатого скота, позволяет фиксировать полиморфизм ДНК и у овец (6). Полученные нами результаты совпадают с вышеупомянутыми.

Ранее такой подход был применим при картировании гена мышечной гипертрофии CLPG овцы, когда соответствующие зонды и праймеры для идентификации полиморфизма по микросателлитам были взяты из числа тех, что применялись при картировании генома коровы. При использовании маркеров, относящихся к 21 хромосоме коровы, было найдено, что в том же порядке, как и у коровы, эти маркеры располагаются в 18-й хромосоме овцы, а ген CLPG был локализован между двумя из них: CSSM18 – CLPG – TGLA 122. Причем тесное сцепление этого гена с молекулярным маркером CSSM18 (3cM) дает возможность легко отбирать баранов-производителей генотипа CLPG/CLPG. Наличие таких производителей позволит получать 100% потомства, проявляющего хозяйственно ценный признак – избыточное развитие мышечной массы, обусловленное геном CLPG (1).

Из результатов проведенной работы следует вывод о том, что из трех проанализированных последовательностей только мономорфный локус 1.1 (Y 07736) является видоспецифичным. В случае мономорфного локуса 1.3 (X 81898) гомология с аналогичным фрагментом генома овцы составила 92,8%, а для полиморфного локуса 42.3(Y 07735) – 82%, что подтверждает гомологичность генетических структур и ка-

риотипов этих видов и, в свою очередь, упрощает синтенное картирование их геномов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И.А. Генетические карты с.-х. животных. Информационно-справочные материалы. Ин-т общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. 1995, 2: 34.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М. Мир, 1984.
3. Сverdlov E.D. Очерки современной молекулярной генетики. Молекулярная генетика. Микробиология и вирусология. 1995, 2: 3-15.
4. Симоненко В.Н., Корохов Н.П., Логинова Ю.А., Шевченко В.Г. Выделение и анализ микросателлитных последовательностей $(TG)_n$ – типа из космидной геномной библиотеки быка. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Боровск, 1999, 38: 64-77.
5. Ansari H.A., Pearce P.D., Maher D.W. et al. Resolving ambiguities in the karyotype of domestic sheep (*Ovis aries*). *Chromosoma*. 1992, 102: 304-307.
6. Ellegren H., Moore S., Robinson N. et al. Microsatellite evolution - a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Mol. Biol. Evol.* 1997, 4(8): 854-860.
7. Gortari M.J., Freking B.A., Kappes S.M. et al. Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Animal Genetics*. 1997, 28: 274-290.
8. Kappes M. Steven, Keele J.W., Stone R.T. et al. A second-generation linkage map of bovine genome. *Genome Res.*, 1997, 7(3): 235-249.
9. Moore S.S., Barendse W., Berger K.T. et al. Bovine et ovine DNA microsatellites from the EMBL and GENBANK databases. *Animal Genetics*. 1994, 23: 463-467.
10. Moore S.S., Sargeant L.L., King T.J. et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*. 1993, 10: 654-660.
11. Ponce de Leon F.A., Ambady S., Hawkins G.A. et al. Development of a bovine X chromosome linkage group and painting probes to assess cattle, sheep and goat X chromosome segment homologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996, 93: 3450-3454.
12. Vainman D., Imam-Gahli M., Moazami-Goadarzi K. Et al. Conservation of a syntenic group of microsatellite loci between cattle and sheep. *Mammalian genome*. 1994, 5: 310-314.
13. Vainman D., Schibler I., Bourgeois F. et al. A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics*. 1996, 144: 279-305.

МИКРОСАТЕЛЛИТЫ – МАРКЕРЫ ЛОКУСОВ ХОЗЯЙСТВЕННО ПОЛЕЗНЫХ ПРИЗНАКОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Т.Ю. Шмидт, В.Г. Шевченко
Лаборатория молекулярной биологии

Одной из основных задач генетики крупного рогатого скота является выявление генов, определяющих формирование хозяйственно-полезных признаков. Для ее успешного решения необходимым условием является наличие легко детектируемых высокополиморфных маркеров с кодоминантным типом наследования. В настоящее время доминирующую роль в качестве таких маркеров играют микросателлитные последовательности ДНК. С их использованием построена самая подробная генетическая карта крупного рогатого скота, которая легла в основу работ по поиску локусов хозяйственно-полезных признаков с помощью ДНК-маркеров.

На данном этапе развития агропромышленного комплекса перед зоотехнической наукой стоит задача совершенствования существующих и разработка новых методов селекции и разведения сельскохозяйственных животных. В связи с этим важное значение имеет создание методов, позволяющих отбирать лучших животных и прогнозировать их племенные и продуктивные качества в раннем возрасте. Еще в 20-е годы А. Е. Серебровский предложил принцип «сигналей», т.е. определение генотипа с помощью маркеров (1). Существовало множество попыток установить связь хозяйственно полезных признаков с различными экстерьерными особенностями животных (величина вымени, размер молочных колодцев, обхват груди за лопатками, толщина кожи и т.д.). Вслед за А. Е. Серебровским К. Сакс в 1923 году выдвинул концепцию поиска локусов хозяйственно полезных признаков с помощью сцепленных с ними маркеров, но она не получила развития из-за недостатка маркеров (40). Только в 60-х годах, с появлением иммунологических, биохимических и ДНК-маркеров эти ограничения были сняты.

В настоящее время накоплен огромный материал об использовании этих маркеров в различных генетических исследованиях, но вместе с тем применение белкового и иммуногенетического полиморфизма в селекционной практике носит ограниченный характер. Отчасти, это вызвано слишком разноречивыми данными, полученными в результате поиска их связи с хозяйственно полезными признаками (4), с другой стороны, это обусловлено довольно низкой степенью полиморфизма у многих домашних животных (6). Прогресс наметился когда был предложен способ анализа генетического полиморфизма на уровне ДНК (3). С появлением генетических маркеров связывают возникновение особого направления в животноводстве – маркернонаправленной (маркерзави-

симой) селекции: оценку потенциальных возможностей животных по их внутренним морфофизиологическим и генетическим особенностям.

Оценка полиморфности ДНК, проведенная на основании отличий последовательностей ДНК разных индивидуумов показала, что каждые два неродственных индивидуума отличаются не менее чем тремя миллионами пар оснований. Различия между двумя геномами не сосредоточены в какой-либо из его специфических областей, а разбросаны по всему геному и, в основном, они концентрируются в некодирующих областях генов. Характерной особенностью эукариотического генома является то, что кодирующие последовательности-гены составляют лишь малую долю наследственного материала (5-10% у млекопитающих). И только небольшое число различий приводит к наблюдаемым на уровне фенотипа изменениям (5).

Сейчас внимание генетиков все больше занимают открытые в последнее десятилетие повторяющиеся фракции геномной ДНК – мини- и микросателлиты, необычайно высокий уровень полиморфизма которых заключается в вариациях количества повторяющихся единиц. С открытием микросателлитных маркеров связывают переход от классической прямой генетики, двигавшейся к идентификации генов от признаков, кодируемых этими генами, к так называемой «обратной» генетике, которая сначала идентифицирует фрагмент генома, а затем занимается выяснением, какой признак определяется этим фрагментом (5). Этот, казалось бы, неочевидный подход, называемый позиционным клонированием, объясняется тем, что геном эукариот имеет сложную организацию, в котором гены не являются независимыми изолированными компонентами, а фенотипические признаки детерминируются сложной цепью взаимоотношений между генами. В этом случае подходы «обратной» генетики позволяют одновременно оценивать состояние многих элементов генома.

Известно, что множество фенотипических признаков, в частности, количественные признаки (quantitative trait loci – QTL) сельскохозяйственных животных, являются полигенными, и что одни и те же фенотипические проявления могут быть следствием мутации разных генов. Поэтому для выявления генетической структуры, определяющей тот или иной фенотипический признак, необходимо установить связь между признаком и локусом генома с какими-либо легко детектируемыми маркерами. В качестве таких маркеров доминирующую роль играют микросателлитные последовательности, обеспечившие настоящий прорыв в изучении генома млекопитающих (28).

Микросателлиты относятся к классу tandemных повторов, которые составляют значительную часть эукариотического генома и, в частности, 23% генома крупного рогатого скота (35). Микросателлитные блоки достаточно равномерно распределены по всему хроматину и присутствуют в составе как транскрибируемых, так и не транскриби-

руемых последовательностей ДНК (40). Основная единица повторов обычно образована 1-6 нуклеотидами, в большинстве случаев они представлены в виде моно [поли (G), поли (A)], ди [поли (TG), поли (TC)], три [поли (CAC), поли (GAC)] или тетрануклеотидных мотивов поли[GATC] (40). Повторение этих мотивов (от 2 до 200 раз) и лежит в основе их высокого полиморфизма, со средним значением PIC 0,6 (43). Находясь внутри уникальных последовательностей, микросателлиты могут быть легко амплифицированы с помощью пар фланкирующих уникальных олигонуклеотидов (48).

В геноме млекопитающих наиболее часто встречаются микросателлиты (TG) $_n$ типа от – 5 до 10×10^4 на геном. По данным М. Soller (40) гаплоидный геном млекопитающих в среднем представляет 3×10^9 п.о., следовательно, на каждые 50-100 т. п. о. (кб.) приходится по одному поли (TG) блоку. В среднем, в зависимости от вида, их представленность составляет 57% от общего числа микросателлитов, затем следуют микросателлиты типа (CT)/(GA) $_n$ – 30%, (TA) $_n$ – 12% и (CG) $_n$ – 0,7% (22).

Микросателлитные последовательности определенным образом расположены в геноме. Так, у крупного рогатого скота поли (TG) повторы, в основном, присутствуют в теломерных и субтеломерных районах хромосом, а у других видов млекопитающих они случайным образом распределяются по всей длине хромосомы (39). У человека и свиньи – в центромерном, теломерном районах, области ядрышкового организатора и промежуточного гетерохроматина плотность этих микросателлитов понижена (41, 50). Другие виды повторов локализованы несколько иначе: (GATA) $_n$ у некоторых видов располагаются на Y хромосоме (38); (GACA) $_n$ – в районе ядрышкового организатора; а (CT) $_n$ повторы образуют кластеры (33).

По структуре микросателлитные последовательности делятся на три типа: совершенные (непрерывная последовательность одного типа), несовершенные (состоят из одной или нескольких прерывающихся последовательностей одного и того же типа) и сложные (состоят из совершенных или несовершенных повторов прерывающихся другими простыми последовательностями) (47, 50). Известно, что из всех типов микросателлитных последовательностей на долю совершенных в среднем приходится 70% (43).

До сих пор все еще не выясненной остается функциональная роль микросателлитных последовательностей. Существует ряд гипотез, связанных с образованием Z-формы ДНК. Предполагается, что биологическое значение левозакрученной Z-формы ДНК заключается в образовании «липкости» для правильного спаривания гомологичных хромосом во время мейотической рекомбинации. Левозакрученную Z-форму ДНК в определенных условиях принимают многократно повторяющиеся

ся, чередующиеся пурин-пиримидиновые последовательности. Доказательством этому служит присутствие микросателлитных последовательностей в областях рекомбинации (13). Напротив, в гетерохроматине dot хромосом большинства видов отсутствуют (TG)_n и (CT)_n повторы, что соответствует данным о том, что эти участки не подвергаются мейотической рекомбинации. Возможно, что блоки (TG)_n могут быть «горячими» точками кроссинговера (42).

В работах по изучению связи между простыми повторами и регуляцией генов было показано неоднозначное влияние этих элементов на генную экспрессию. Так инсерция (CA)_n увеличивает генную экспрессию в энхансере SV40. Было обнаружено, что тандемным повторам свойственны отдельные характеристики *viral* энхансеров: они на расстоянии увеличивают генную экспрессию и при близком расположении к промотору являются наиболее эффективными. А очень длинная (TG)_n последовательность, локализованная на расстоянии 1260 п.о. от гена пролактина крысы, оказывает негативное влияние на транскрипционную активность (34). Также установлено, что вариации в длине некоторых тринуклеотидных повторов являются причиной ряда наследственных заболеваний: синдрома хрупкости X-хромосомы, болезни Хандингтона, миотонической дистрофии. В частности, при увеличении числа тринуклеотидных повторов CGG в первом экзоне FMR1 гена с 50 до 200, внешне здоровые носители производят больное потомство, у которого полностью проявляется болезнь – синдром хрупкости X-хромосомы, которая начинается при увеличении числа повторов свыше 200. Существует предположение, что простые повторы участвуют в конденсации и упаковке ДНК (41). Такие свойства микросателлитов как высокий полиморфизм (48), равномерная представленность, частота встречаемости (41) и простота детекции с помощью ПЦР делают эти последовательности удобным инструментом для анализа генома и построения генетических карт.

За последнее десятилетие появились генетические карты крупного рогатого скота (10-12, 25, 29, 30, 32), свиней (8, 23, 36), овец (15, 20), коз (44). А также имеются сведения о работах по построению генетических карт, по крайней мере, еще у 30 видов млекопитающих (21). Самая подробная генетическая карта крупного рогатого скота (со средним расстоянием между маркерами 2,5 сМ), созданная в 1997 году S.M. Каррес с соавт., на 94% состоит из микросателлитов. Эта генетическая карта II поколения с общей протяженностью 2990сМ, построенная с помощью 1236 полиморфных ДНК маркеров, дала возможность приступить к поиску информативных микросателлитных маркеров для выявления локусов, определяющих как моно-, так и полигенные хозяйственно полезные признаки крупного рогатого скота.

В самых первых работах микросателлитные маркеры использовались для картирования мажорных генов. Так, M. George с соавт. (26)

продемонстрировали генетическое сцепление микросателлитных маркеров первой хромосомы GMPOLL-1 и GMPOLL-2 с геном комолости. Далее Georges et al. было показано сцепление микросателлитного локуса TGLA 116, отнесенного к группе синтении 13, с геном «weaver» (Zmax-8,15; Q-0,03), вызывающем генетическую болезнь progressive degenerative myeloencephalopathy (weaver disease), которая ассоциирована с высокой молочной продуктивностью у крупного рогатого скота. Эта работа дала возможность использовать микросателлит TGLA 116 для выявления носителей болезни и для изучения влияния соответствующего хромосомного региона на молочную продуктивность у Brown Swiss и других пород скота (27).

Несколько позже бельгийскими учеными было установлено сцепление между локусом mh, вызывающим фенотип двойной мускулистости (гипертрофия мышц) в гомозиготном состоянии, и микросателлитным маркером TGLA 44, расположенным на 2 хромосоме крупного рогатого скота. Подобный ген, имеющий символ CLPG, был выявлен и у овец, но он расположен на 18 хромосоме и тесно связан с молекулярным маркером CSSM18. Последнее дает возможность легко отбирать баранов-производителей генотипа CLPG/CLPG, в потомстве которых можно получить 100% особей, проявляющих избыточное развитие мускулатуры. У ягнят этого генотипа на 32% мышечной массы больше, чем у clrg/clrg, а жира в мясе значительно меньше (2). Эти исследования проложили путь будущей маркернонаправленной селекции по признаку двойной мускулистости (16). Этим же авторам удалось найти сцепление локуса чалой окраски, типичной для бельгийской голубой породы скота, с микросателлитными маркерами BT1 и AGLA 293 (Lod score 2, 11), расположенными на 5 хромосоме. Чалый окрас является «продуктом» двух кодоминантных аллелей (r/black) и (R/white). Аллель R является главным фактором развития наследственного заболевания White Heifer (17).

Первой работой по изучению влияния QTL у молочного скота с помощью ДНК-микросателлитов были исследования, проведенные Ron M. и др. Авторы, применяя подход «внучек», провели генотипирование с использованием 10 микросателлитных маркеров крупного рогатого скота, принадлежащего к семи линиям израильских голштинов. В схеме эксперимента предусматривалось типирование с помощью генетических маркеров гетерозиготных производителей и их сыновей, а для статистического анализа брались данные о количественных признаках внучек. Было установлено влияние отцовских аллелей локуса D21S4 на величину удоя и количество молочного жира с достоверностью $P < 0,025$. Потомки, наследовавшие аллель 18, отличались более высокой молочной продуктивностью и белковомолочностью по сравнению с теми, которые получили от отца аллель 21 (37).

Наиболее масштабное исследование было предпринято Georges с соавторами в 1995 году. Эта работа стала основополагающей для генетического картирования локусов, влияющих на молочную продуктивность крупного рогатого скота. В результате генотипирования 1518 быков, оцененных по качеству потомства, на основании данных о молочной продуктивности более чем 150000 дочерей, по 159 микросателлитам было показано на пяти хромосомах (1, 6, 9, 10 и 20) с высокой достоверностью (Lod score > 3) наличие QTL, контролирующих молочную продуктивность (29). Исследования финских ученых Villki et al. по генотипированию потомков 453 быков, принадлежащих к 11 полусибсовым линиям айрширской породы по шести микросателлитам, расположенным на 9 хромосоме, подтвердили существование локуса, который влияет на величину удоя и количество белка (46). В 12 полусибсовых семьях этой породы Velmala et al. в 1999 году было проведено сканирование 6 хромосомы. Для идентификации QTL, влияющих на молочную продуктивность, использовались 11 микросателлитных маркеров и казеиновых гаплотипов, а также следующие признаки продуктивности: удой, жирномолочность, белковомолочность, количество молочного жира, количество молочного белка. Результаты подтвердили наличие двух QTL, влияющих на молочную продуктивность, расположенных на 6 хромосоме, причем, один из них расположен рядом с казеиновым кластером (45).

W. Sorpieters с соавт., используя 215 микросателлитных маркеров, провели полное геномное сканирование локусов, охватывающих 2947 сМ генома крупного рогатого скота (30) у 1158 оцененных по потомству быков с целью картирования QTL, влияющих на молочную продуктивность и состав молока. Они обнаружили локус на центромержном конце хромосомы 14 с мажорным эффектом на величину удоя, белковомолочность и жирномолочность (19).

Для подтверждения картирования QTL, обеспечивающего жирномолочность у крупного рогатого скота, который сцеплен с локусом амилазы-1 сыворотки AM-1 (7), было проведено генотипирование пяти ранее изученных и семи новых полусибсовых семей по 9 микросателлитам, расположенным на 4 хромосоме. Локус AM-1 был картирован между двумя микросателлитными маркерами BMS648 и BR6303. В ранее исследованных семьях было установлено его достоверное влияние на процент жира и процент белка, а в новых – на количество молока и количество молочного жира. Наиболее вероятное соседство QTL обеих групп было выявлено в том же районе 4 хромосомы, что и локус obese. Однако строгого доказательства ассоциации между локусом obese и тестируемыми локусами обнаружено не было (31). Ген obese (продукт лептин) является гипотетическим геном – кандидатом характеристик жиροотложения у быков мясных пород. С целью проверки этой гипотезы было проведено генотипирование 158 чистокровных быков пород

Angus, Charolais, Hereford, Simmental с использованием микросателлитного маркера BM1500, расположенного рядом с локусом obese. Было обнаружено 4 аллеля этого микросателлита. Представительство аллеля размером в 138 п.о. в генотипе коррелировало с высоким уровнем жиротложения, а аллель 147 п.о. имел противоположный эффект. У быков Angus и Hereford наиболее часто встречался аллель 138 пар оснований, а у Simmental и Charolais – 147 пар оснований. Эту информацию можно использовать в селекции и разведении для регуляции производства говядины разной жирности в зависимости от потребительского спроса (24).

Ген лептина (obese) был ранее локализован на 4 хромосоме. Продукт этого гена, как предполагают, регулирует аппетит и отложение жира. Было обнаружено внутри последовательности гена наличие микросателлита 5'-(A)16(TA)20-3' в 5'УТР районе, соответствующем 247-282 нуклеотидам данной последовательности. После генотипирования 97 особей было обнаружено 18 аллелей. Наличие этого высокополиморфного маркера внутри гена лептина крупного рогатого скота может играть большую роль в селекции молочного и мясного скота и в дальнейших генетических исследованиях (49).

M.S. Ashwell исследовал QTL, влияющие на экстерьерные особенности в семи линиях американских голштинов с помощью 16 микросателлитных маркеров, расположенных на 10 хромосомах. Так с помощью маркера BM203 он показал, что локус, влияющий на форму вымени и молочную продуктивность, локализован на 27 хромосоме. Маркер BM1258 на 23 хромосоме тесно коррелировал с глубиной вымени. Были проведены многовариантные анализы глубины вымени и числа соматических клеток с использованием маркеров 513 и BM1258. Оба маркера оказались сопряжены с двумя этими признаками. Маркер BM4204 9 хромосомы был тесно связан с комбинированным индексом признаков, имеющих отношение к постановке конечностей, показывая, что один или несколько локусов, влияющих на эти признаки, могут находиться на 9 хромосоме (9).

В данном обзоре делается попытка привлечь внимание генетиков и селекционеров к проблеме поиска QTL у сельскохозяйственных животных отечественных пород, т.к. в области генетики количественных признаков, полученные результаты правомочны только для конкретно изученных объектов (пород) и не допускают однозначного переноса на другие породы или виды, в том числе и на отечественные. При этом надо иметь в виду, что микросателлитные маркеры могут быть использованы для выявления внутри- и межпородного полиморфизма и определения характера генетических различий в связи с пороодообразованием и племенными качествами крупного рогатого скота, а также для верификации родословных.

Таким образом, еще недавно считавшиеся теоретическими посылки о возможном использовании микросателлитных маркеров для генетического картирования локусов хозяйственно полезных признаков, в настоящее время приобрели практическую значимость, представляющую экономический интерес. Тем не менее, несмотря на очевидные преимущества, ДНК-маркеры до сих пор не получили массового распространения в генетических и селекционно-генетических исследованиях в нашей стране. Представленные литературные данные отнюдь не отражают полную мировую сводку материалов по изложенной проблеме, интенсивность разработок которой непрерывно возрастает с каждым годом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И.А. Генетическое картирование генома крупного рогатого скота. Цитология и генетика, 1992, 26, 5: 67-72.
2. Захаров И.А., Никифоров В.С., Степанюк Е.В. Генетическое картирование сельскохозяйственных животных. Успехи современной генетики, 1993, 18: 36-74.
3. Захаров И.А. генетическое картирование генома крупного рогатого скота. Цитология и генетика, 1992, 26, 5: 67-72.
4. Меркурьева Е.К. Генетические основы селекции в скотоводстве. М.: Колос, 1977: 240.
5. Свездлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики. Молекулярная генетика. Микробиология и вирусология. 1995, 2: 3-15.
6. Сулимова Г.Е. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК у сельскохозяйственных животных. Успехи современной генетики. 1993: 3-30.
7. Andersson-Eklund L. & J. Rendel. Linkage between amylase-1 locus and a major gene for milk fat content in cattle. Anim. Genet., 1993, 24: 101-103.
8. Archibald A.L., Haley J.F., Brown S. et al. The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). Mamm. Genome, 1995, 6 :157-175.
9. M.S. Ashwell, J. Da, P.M. Vanraden et al. Detection of putative loci affecting conformational type traits in an elite population of United States Holsteins using microsatellite markers. J. Dairy Sci., 1998, 81: 1120-1125.
10. Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M. et al. A genetic map of the bovine genome. Nature genet., 1994, 6: 227-235.
11. Barendse W., Vainman D., Kemp S.I. et al. A medium density genetic linkage map of the bovine genome. Mammalian genome, 1997, 6: 21-28.
12. Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W. et al. A genetic linkage map for cattle. Genetics, 1994, 136: 619-639.
13. Blaho J.A. and Wells R.D. Left-handed Z-DNA and genetic recombination. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular biology, 1989, 37: 107-126.
14. Braaten D.C., J.R. Thomas, R.D. Little, et al. Locations and contexts of sequences that hybridize to poly(dG-dT)(dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. Nucleic Acids Res. 1988, 16: 865.

15. Broad T.E., Hill D.E. Mapping the sheep genome: practice, progress and promise. *Brit. vet. J.* 1994, 150: 237-252.
16. Charlier C., Coppieters W., Farnir F. et al. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm. Genome*, 1995, 6: 788-792.
17. Charlier C., Denys B., Belanche J.I. et al. Microsatellite mapping of the bovine roan locus: A major determinant of White Heifer Disease. *Mamm. Genome*, 1996, 7: 138-142.
18. Ciampolini R., Moazami-Goudarsi K., Vainman D. et al. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms for permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J. Anim. Sci.* 1995, 73, 11: 3259-3268.
19. Coppieters W., J. Riquet, J. Arrauz et al. A QTL with vajor effect jn milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mamm. Genome*, 1998, 9: 540-544.
20. Crawford A.M., Dodds K.G., Ede A.J. et al. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*, 1995, 140: 703-724.
21. Editorial G. Genome Mapping in domestic animals. 1994, *Br. Vet. J.*, 150: 215-217.
22. Ellegren H. *Genome Analysis with Microsatellite Markers*. Sweden. Uppsala. 1993: 85.
23. Ellegren H., Chowdhary B., Johansson M. et al. Integrating the porcine physical and lincage map using cosmid- derived markers. *Animal Genetics*, 1994, 25:155-164.
24. C.J. Fitzsimmons, S.M. Schutz, R.O. Bergen, J.J. Mckimnon. A Potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mamm. Genome*, 1998, 9: 432-434.
25. Fris R., Eggen A., Womack J.E. The bovine genome map. *Mammalian Genome*, 1993, 4:405-428.
26. M.George, R. Drinkwater, T. King et al. Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in *Bos taurus*. *Nature Genetics*, 1993, 4: 206-210.
27. Georges M., Dietz A.B., Mishra A. et al. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 1993a, 90: 1058-1062.
28. Georges M., Gunawardana A., Threadgill D.W. et al. Characterization of a set of a variable number of tandem repeat markers conserved in Bovidae. *Genomics*, 1991, 11: 24-32.
29. Georges M.D., Nielsen M., Mackinnon M. et al. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, 1995, 139: 907-920.
30. Kappes M. Steven, Keele J.W., Stone R.T. et al. A second-generation lincage map of bovine genome. *Genome Res.*, 1997, 7, 3: 235-249.
31. M. Lindersson, L. Andersson-Eclund, D.-J. de Koning, et.al. Mapping of Serum Amylase-I and quantitative trait loci for milk produktion traits to cattle chromosome 4. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81: 1454-1461.
32. Ma R.Z., Beever J. E., Da Y. et al. A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J. of Heredity.* 1996, 87: 261-271.

33. Nanda I., Deubelbeiss C., Guttenbach M. et al. Heterogeneities in the distribution of (GACA)_n simple repeats in the karyotypes of primates and mouse. *Human Genetics*, 1990, 85:187-194.
34. Naylor L.H. and Clarc E.M. d(TG)_nd(CA)_n sequences upstream of the rat prolactin gene from Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acid Res.*, 1990, 18:1595-1601.
35. J. Perret, Y-C/ Scia, R. Fries et al. A polymorphic satellite sequence maps to the pericentric region of the bovine Y chromosome. *Genomics*, 1990, 6: 482-490.
36. Rohrer G.A., Alexander L.J., Hu Z. et al. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.*, 1996, 6: 371-391.
37. Ron M., Band M., A. Yanai et al. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. *Animal Genetics*. 1994, 25: 259-264.
38. Schafer R., Ali S. and Epplen J.T. The organization of the evolutionary conserved GATA/GAGA repeats in the mouse genome. *Chromosoma*, 1986, 25: 502-510.
39. Solinas-Toldo S., Lengauer C. and Fries R. Comparative Genome Map of human and Cattle. *Genomics*, 1995, 27:489-496.
40. Soller M. Genetic mapping of the Bovine Genome Using Deoxyribonucleic Acid-Level Markers to Identify Loci Affecting Quantitative Traits of Economic Importance. *J. Dairy Sci.*, 1990, 73: 2682-2646.
41. Stallings R.L., Ford A.F., Nelson D. et al. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 1991, 10: 807-815.
42. Vainman D., Imam-Gahli M., Moazami-Goadarzi K. Et al. Conservation of a syntenic group of microsatellite loci between cattle and sheep. *Mammalian genome*, 1994, 5: 310-314.
43. Vainman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi et al. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian genome*, 1994, 5: 288-297.
44. Vainman D., Schibler I., Bourgeois F. et al. A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics*, 1996, 144: 279-305.
45. Velmala R.J., Vilkki H.J., Elo K.T., et al. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Anim. Genet.*, 1999, 30: 2136-2143.
46. Vilkki H.J., Koning D.J., Elo K. Et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci of Finnish dairy cattle by regression. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80, 1: 198-204.
47. Weber J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n(dC-dT)_n polymorphism. *Genomics*, 1990, 7: 524-530.
48. Weber J.L. and P.E. May. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. 1989 *Am. J. Human Genetics*, 44: 388.
49. R.J. Wilkins, H.W. Davey. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. *Anim. Genet.*, 1997, 28:3 70-383.
50. Wintero A.K., Fredholm M. and Thomsen P.D. Variable (dG-dT)_n(dC-dA)_n Sequences in the Porcine Genome. *Genomics*, 1992, 12: 281-288.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ВЕГЕТАТИВНОЙ И КОНЬЮГАТИВНОЙ РЕПЛИКАЦИИ И ЕЕ СВЯЗЬ С МЕЖВИДОВОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ПЛАЗМИД

В. В. Алёшин, С. Г. Карпушина, Б. В. Тараканов
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного
тракта
Государственный НИИ генетики и селекции промышленных микроор-
ганизмов

Экспериментально показано взаимодействие между процессами вегетативной и конъюгативной репликации плазмид, воспроизводимых по механизму катящегося кольца. Доказано рестрицирующее значение плазмиды RP4 на репликацию неродственных плазмид rLF, содержащих в своем составе фрагмент ДНК (oriT) плазмиды IncPα группы несовместимости. В качестве одного из способов взаимодействия этих плазмид в биплазмидных клетках хозяйского штамма установлено gesA-независимое образование коинтегратов. На основе сконструированной изогенной пары показана физиологическая неравноценность плазмид с отличающейся ориентацией oriT, в частности, различная скорость роста хозяйских клеток в условиях потребности в белке, кодируемом плазмидой, и различная частота конъюгативной мобилизации плазмид.

Введение

Выяснение взаимосвязи основных особенностей организации плазмид, ответственных за конъюгативную и вегетативную репликацию, относится к важным фундаментальным и прикладным задачам биотехнологии микроорганизмов. Использование плазмидных векторов для генной инженерии предполагает направленное изменение их структуры с заданными последствиями для репликации конечных конструкций в клетках бактерий. Кроме того, необходимо учитывать возможности конъюгативной репликации в ходе мобилизации малых плазмид конъюгативными помощниками. С одной стороны, эти процессы могут быть частью работы по введению генетического материала в клетки микроорганизмов, не имеющих систем естественной физиологической компетентности. В этих случаях исследователям необходимо обеспечить благоприятные условия для конъюгативной репликации. С другой стороны, возможна непредусмотренная конъюгативная мобилизация полученных генноинженерных конструкций в природе, способная привести к нежелательному распространению детерминат устойчивости к антибиотикам и генов, продукты которых физиологически активны в отношении позвоночных. В этих случаях необходимо создать условия,

препятствующие такому распространению плазмид. Наконец, возможны ситуации, когда особенности, благоприятствующие конъюгативной репликации, осложняют вегетативную репликацию, и наоборот. Следовательно, необходимо учитывать влияние структурных особенностей плазмид на вегетативную и конъюгативную репликацию и возможное взаимодействие этих процессов.

Целью исследования была оценка влияния на вегетативную и конъюгативную репликацию ориентации в плазмидах области начала конъюгативной мобилизации, внесенной в них генноинженерными методами.

Материал и методы

В работе использовали различные плазмиды – производные природной плазмиды pLF1311 из *Lactobacillus fermentum*, которая способна к репликации в широком круге хозяев (1). Ее хлорамфениколрезистентные производные несут ген *cat* из плазмиды pC194 (2), а мобилизуемые производные несут дополнительно локус *mob* из плазмиды pSUP5011 (3) и могут быть мобилизованы RP4 — плазмидой-помощником IncP α -группы несовместимости. Некоторые из производных pLF1311 были описаны ранее (4-6), описание других дается в этой работе. Для их выращивания использовали клетки кишечных палочек штаммов TG1, HB101 (7) или C600*recA::Tn10*. Кишечные палочки культивировали при 37°C на среде LB (7) с добавлением, в случае выращивания бактерий с плазмидами pLF, хлорамфеникола до концентрации 15 мкг/мл в агаризованные или 5 мкг/мл в жидкие среды. При выращивании жидких культур кишечной палочки применяли интенсивную аэрацию с помощью термостатированной роторной качалки (при 200 об/мин). Оптическую плотность измеряли ФЭК при длине волны 540 нм. Энтерококки культивировали при 37°C без аэрации в жидкой среде M21 (8), лактобациллы — на среде MRS. В качестве твердых сред использовали агаризованную MRS, M21 или триптозный агар (Ferak) с добавлением 1% глюкозы и индикатора – бромкрезолового пурпурового. Для создания селективных условий при выращивании плазмид pLF в среды вносили хлорамфеникол до концентрации 10 мкг/мл.

Для введения плазмидной ДНК в клетки *Escherichia coli* HB101 и грамположительных бактерий использовали методику конъюгативной мобилизации (9). Процедура скрещивания описана ранее (6). Проводили как скрещивание с предварительно полученным биплазмидным донором, так и тройные скрещивания. При передаче плазмиды RP4 (Ap^RTc^RKm^RCm^S) или различных производных pLF (Cm^R) между кишечными палочками использовали антибиотические маркеры плазмид

и хромосомную устойчивость к стрептомицину *E. coli* HB101. Контрselection грамотрицательного донора в скрещиваниях со стрептококками и лактобациллами осуществляли, добавляя полимиксин В до концентрации 100 мкг/мл. Выделение плазмидной ДНК, рестриктное картирование, лигирование, трансформацию клеток кишечных палочек осуществляли по известным методикам (7).

Результаты и обсуждение

Влияние ориентации oriT на кинетику роста. Для изучения влияния взаимной ориентации *ori+* и *oriT* была сконструирована пара изогенных плазмид pLF18 и pLF19 (рис. 1). Участок *mob* в них представляет фрагмент ДНК из pSUP5011 размером 0,3 т.п.н. между сайтами *RsaI* и *Eco47III*. Этот участок содержит *nis* сайт и является достаточным для эффективной мобилизации плазмидой-помощником (10). Плазмиды pLF18 и pLF19 отличаются друг от друга только ориентацией *oriT* и фланкирующими сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции. На рис. 2 приведены кривые роста штаммов, несущих pLF18 и pLF19, так же как биплазмидных штаммов, содержащих дополнительно RP4. Измерение роста плазмидных штаммов производили в жидкой среде, разбавляя стационарную культуру соответствующего штамма в 100 раз. Для плазмидных штаммов в среды вносили хлорамфеникол в селективирующей концентрации. Кривые роста отражают таким образом наработку плазмидой хлорамфениколацетилтрансферазы. Поскольку pLF18 и pLF19 содержат один и тот же ген *cat* под одним и тем же промотором, сила которого не может зависеть от присутствия в клетке RP4, уровень продукции хлорамфениколацетилтрансферазы скорее всего связан с копийностью, следовательно, эффективностью репликации плазмид. Несущие дополнительно RP4 штаммы достигают, в присутствии селективирующих концентраций хлорамфеникола, типичной для стационарной фазы плотности, но им требуется для этого больше времени. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что RP4 замедляет скорость репликации мобилизуемых плазмид. Это проявляется на кривых как снижением угла наклона (удлинением времени генерации), так и удлинением лаг-фазы после разбавления культуры.

Замедление роста кишечных палочек, обусловленное RP4, проявляется на клетках, несущих как одну, так и другую изученные плазмиды, но выражено для них в разной степени. Оно гораздо сильнее для pLF18, тогда как время лаг-фазы для клеток *E. coli* HB101 (pLF19, RP4)

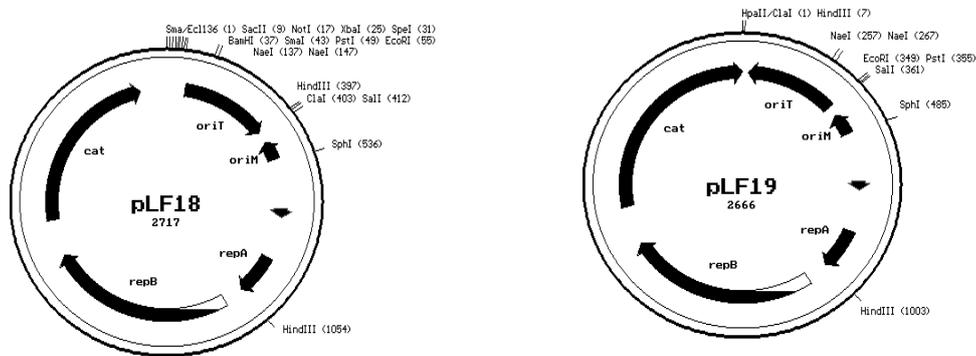


Рис. 1. Структура изогенных плазмид pLF18 и pLF19. Короткая стрелка показывает положение и ориентацию *ori+*; *oriM* – область предпочтительного начала конверсии одноцепочечного интермедиата при репликации плазмиды в лактобациллах; направление конъюгативного переноса при мобилизации показано стрелкой при *oriT*.

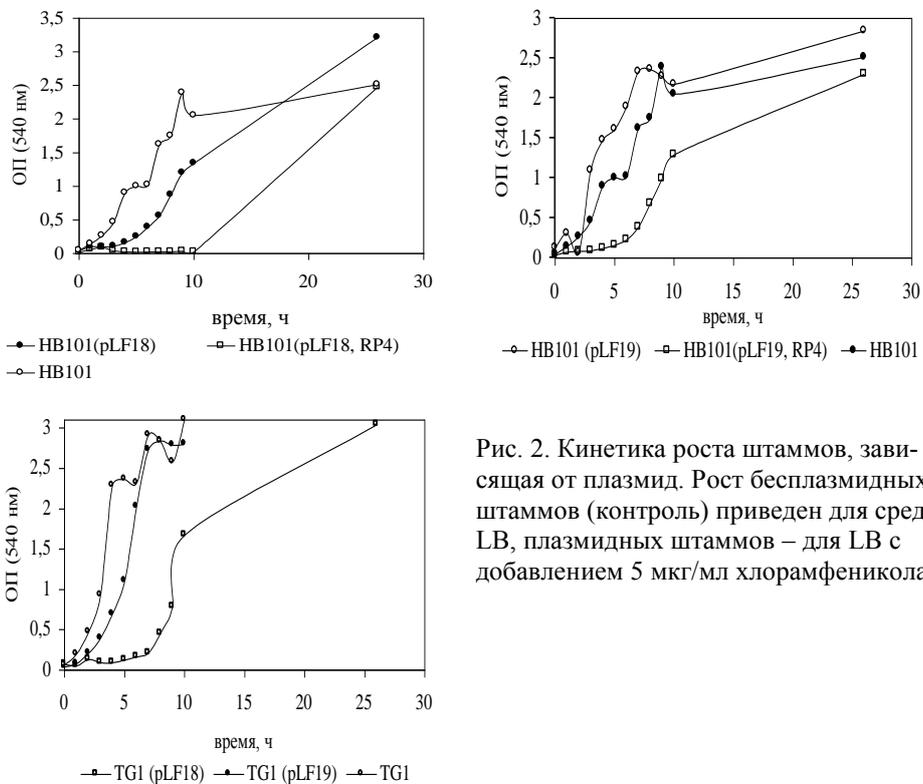


Рис. 2. Кинетика роста штаммов, зависящая от плазмид. Рост бесплазмидных штаммов (контроль) приведен для среды LB, плазмидных штаммов – для LB с добавлением 5 мкг/мл хлорамфеникола.

не превышает 5 часов от момента разбавления, а для *E. coli* HB101 (pLF18, RP4) оно составляет 10 часов (рис. 2а, б). Отмеченные различия проявляются и в росте других штаммов, несущих соответствующие плазмиды (табл. 1).

Дополнительные эффекты на скорость роста клеток, зависящие от структуры плазмид, наблюдаются на штаммах, не содержащих RP4. В отсутствие RP4 хлорамфеникол в использованных концентрациях практически не оказывает супрессирующего влияния на штаммы с pLF19, тогда как для штаммов, зависимых от pLF18, он приводит к заметному удлинению лаг-фазы. Эффект этих факторов не такой сильный, как эффект RP4: к 10 часам роста штамм TG1 (pLF18) находится в середине логарифмической фазы роста и его оптическая плотность достигает половины от стационарного значения (рис. 2в).

Эффективность «двойных» и «тройных» скрещиваний. Рестрицирующий эффект плазмиды-мобилизатора заставляет предполагать, что не всегда биплазмидный донор оптимален для конъюгативного переноса. Для проверки этого предположения были проведены контрольные эксперименты, в которых использованы доноры, несущие различные мобилизуемые плазмиды. В случае «двойного» скрещивания в качестве доноров использовали специально сконструированные штаммы кишечной палочки, несущие плазмиду-мобилизатор RP4 и одну из мобилизуемых плазмид семейства pLF: *E. coli* TG1 (RP4, pLF21) (5) или *E. coli* TG1 (RP4, pLFA1) (4). В качестве реципиентов использовали штаммы молочнокислых бактерий: *Lactobacillus fermentum* 90TC4, *L. plantarum* 8PA3 и *E. faecium* M-74. При «тройных» скрещиваниях использовали два донора, один из которых содержал только мобилизуемую плазмиду, а другой — плазмиду-помощник RP4. При постановке скрещивания брали одинаковые количества ночных культур обоих доноров. Условия проведения конъюгативных мобилизаций в обоих случаях были одинаковыми. При «двойных» скрещиваниях с использованием донорных штаммов *E. coli* TG1 (RP4, pLFA1) и *E. coli* TG1 (RP4, pLFA5) колонии трансконъюгантов не были получены ни с одним из реципиентов (частота мобилизации составляла менее 10^{-9} на клетку донора). В то же время при проведении в аналогичных условиях «тройных» скрещиваний, в которых использовали такие же мобилизуемые плазмиды и такие же реципиентные штаммы, происходил перенос плазмид с частотой от 10^{-9} до 10^{-6} .

При постановке «двойных» и «тройных» скрещиваний, где в качестве доноров использовали штаммы *E. coli*, несущие мобилизуемую плазмиду pLF21 и мобилизующую плазмиду RP4, а в качестве реципиента — штамм *E. faecium* M-74, трансконъюганты были получены в обоих случаях. Однако частота переноса при «двойном» скрещивании

Таблица 1. Рост штаммов, зависимый от обеспечиваемой плазмидой устойчивости к хлорамениколу

Штамм	Время, ч											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	26
TGI (pLF18)	0,075	0,053	0,129	0,092	0,093	0,121	0,161	0,211	0,453	0,078x10	0,167x10	0,304x10
TGI (pLF19)	0,036	0,080	0,211	0,389	0,695	0,110x10	0,202x10	0,273x10	0,284x10	0,279x10	0,28x10	0,200x10
HB101 (pLF18)	0,040	0,098	0,099	0,108	0,160	0,250	0,393	0,056x10	0,087x10	0,120x10	0,134x10	0,321x10
HB101 (pLF19)	0,127	0,303	0,650	1,092	1,473	0,161x10	0,189x10	0,233x10	0,236x10	0,227x10	0,217x10	0,284x10
HB101 (RP4 + pLF18)	0,015	0,057	0,088	0,037	0,023	0,022	0,025	0,023	0,024	0,034	0,024	0,247x10
HB101 (RP4 + pLF19)	0,035	0,076	0,086	0,089	0,112	0,160	0,226	0,384	0,682	0,099x10	0,129x10	0,230x10
C600recA ⁻ (pLF18)	0,034	0,096	0,113	0,074	0,070	0,077	0,072	0,043	0,080	0,101	0,079	0,238x10
C600recA ⁻ (pLF19)	0,039	0,055	0,091	0,067	0,069	0,086	0,084	0,091	0,111	0,124	0,048	0,148x10
C600recA ⁻ (RP4 + pLF18)	0,021	0,043	0,032	0,034	0,033	0,032	0,032	0,033	0,036	0,039	0,035	0,725
C600recA ⁻ (RP4 + pLF19)	0,040	0,119	0,161	0,283	0,688	0,133x10	0,253x10	0,367x10	0,370x10	0,393x10	0,428x10	0,308x10
TGI	0,058	0,195	0,470	0,927	2,286	0,236x10	0,232x10	0,291x10	0,283x10	0,258x10	0,310x10	0,250x10
HB101	0,046	0,143	0,265	0,463	0,899	0,100x10	0,102x10	0,162x10	0,175x10	0,239x10	0,205x10	0,251x10
HB101 (RP4)	0,215	0,484	0,877	1,467	1,992	0,238x10	0,309x10	0,342x10	0,296x10	0,329x10	0,341x10	0,326x10
C600recA ⁻	0,215	0,457	0,786	1,293	1,86	0,212x10	0,326x10	0,306x10	0,315x10	0,274x10	0,373x10	0,263x10
C600recA ⁻ (RP4)	0,117	0,364	0,700	0,375x 3	0,553x 3	0,174x 10	0,210x 10	0,257x 10	0,214x 10	0,218x 10	0,202x 10	0,185x 10

составляла $1,5 \times 10^{-9}$ и была примерно в 10 раз меньше, чем частота переноса при «тройном» скрещивании, которая была равна $1,2 \times 10^{-8}$.

Таким образом, можно сделать вывод, что «тройные» конъюгативные скрещивания между *E. coli* и молочнокислыми бактериями нередко проходят более эффективно, чем «двойные». Это может быть связано с тем, что при нескольких пересевах донорных штаммов, содержащих мобилизующую и мобилизуемую плазмиды, между плазмидами образуются коинтеграта RP4::pLF, которые не способны переноситься при скрещивании в молочнокислые бактерии. Кроме того, при длительном культивировании число копий мобилизуемой плазмиды в клетках донора, несущего две плазмиды, может уменьшаться вследствие рестрицирующего воздействия продуктов *tra*-генов плазмиды RP4.

Образование коинтегратов. Для измерения частот образования коинтегратов из каждого из биплазмидных штаммов *E. coli* HB101 (pLF18, RP4) и *E. coli* HB101 (pLF19, RP4), проявляющих устойчивость к четырем антибиотикам (хлорамфениколу, ампициллину, канамицину, тетрациклину), после нескольких пассажей на среде с хлорамфениколом выделяли плазмидную ДНК, которой проводили трансформацию кишечных палочек с отбором по хлорамфениколу — маркеру плазмид pLF18 и pLF19. Выросшие колонии перепечатывали с помощью репликатора на чашки с ампициллином, тетрациклином и канамицином. Оказалось, что в случае плазмиды pLF19 среди 50 проверенных трансформантов не было ни одного, устойчивого к прочим антибиотикам, тогда как все 50 хлорамфениколу-устойчивых колоний, полученных после трансформации препаратом ДНК из штамма, несшего pLF18, были одновременно устойчивы и к остальным перечисленным антибиотикам. Это свидетельствует о существовании pLF18 в биплазмидных штаммах в основном в виде коинтегратов с RP4 (RP4::pLF18). Мы относим это за счет результирующей двух давлений отбора: селекцией против свободно реплицирующейся pLF18 – рестрикцией, вызванной релаксирующим комплексом кодируемых RP4 белков TraI-TraJ-TraK, и селекцией против клеток, утративших pLF18 присутствующим в среде антибиотиком. На плазмиду pLF19 рестрицирующее действие RP4 сказывается, очевидно, в меньшей степени, в суммарном препарате плазмидной ДНК много молекул этой многокопийной, лучше трансформирующей плазмиды, которая и трансформирует преимущественно компетентные клетки, которые отбираются на среде с хлорамфениколом.

Следует отметить, что образование коинтегратов в данном случае происходило в хозяйских клетках *E. coli* HB101, обладающих мутацией *recA*, то есть с нарушенной системой общей генетической рекомбинации, что свидетельствует в пользу участия в их образовании системы сайт-специфической рекомбинации по локусу *oriT*.

*Модификация *repV* гена.* При определении функциональных областей плазмиды pLF1311 была доказана необходимость для ее репли-

кации полноценного гена *repB*, продукт которого требуется как транскриптивный фактор. В ходе более детальных исследований мы описали возможность модификации 3'-концевого района структурной части этого гена без ущерба для репликации в клетках кишечных палочек (4). В настоящее время осуществлена конъюгативная мобилизация модифицированной плазмиды pLFA1 в клетки молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 90TC4, *L. plantarum* 8PA3 и *Enterococcus faecium* M-74, где плазида pLFA1 стабильно наследуется. Таким образом, модифицированный белок RepB способен обеспечивать нормальную репликацию плазмиды, независимо от вида бактерии.

Таким образом, для решения основной экологической задачи – сохранения в природе, малые криптоэпителические плазмиды грамположительных бактерий, к которым относится pLF1311, используют репликацию по механизму катящегося кольца. Конъюгативная репликация обеспечивает колонизацию новых бактериальных клеток. В этом процессе важную роль играет область начала конъюгативного переноса (*oriT*), в которой в плазмидную ДНК белком TraI (при участии некоторых других белков) вносится одноцепочечный разрыв, специфический для цепи, с которого начинается конъюгативная репликация. Другая мишень для внесения однонитевого разрыва в плазмидную ДНК — область начала вегетативной репликации (*ori+*), которая у плазмид этого типа осуществляется, как и конъюгативная, по механизму катящегося кольца. Она направляется закодированным в плазмидном геноме белком RepB и обеспечивает репликацию и наследование плазмиды в исходном штамме. Очевидно, наличие двух разрывов в ДНК при одновременном протекании в клетке вегетативной и конъюгативной репликации может оказывать неблагоприятное воздействие на сохранение полноразмерной плазмиды. Эта причина может лежать в основе описанного в настоящей работе замедления скорости роста и удлинения лаг-фазы для бактериальных клеток на среде с хлорамфениколом, вызванного присутствием в них RP4 в дополнение к pLF18 или pLF19.

Мы предположили, что различная локализация одноцепочечных разрывов на одной или на двух разных нитях плазмидной ДНК, зависящая от ориентации *oriT*, может влиять на физиологические свойства плазмид. Это предположение тоже получило экспериментальное подтверждение. Так, в плазмиде pLF18 ориентация *oriT* такова, что одноцепочечный разрыв вносится в плюс-нить, как и при вегетативной репликации (рис. 3). Таким образом, два возможных разрыва происходят в одной из нитей ДНК плазмиды. В изогенной плазмиде pLF19 имеет место обратная ситуация – разрывы происходят в противоположных цепях ДНК. Экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что разрывы в одной нити оказывают более сильное рестрицирующее воздействие на репликацию плазмид, чем разрывы в противоположных цепях ДНК. Эти данные относятся к кинетике роста бактериальных

культур, частотам образования RP4::pLF коинтеграторов и эффективности «двойных» и «тройных» скрещиваний.

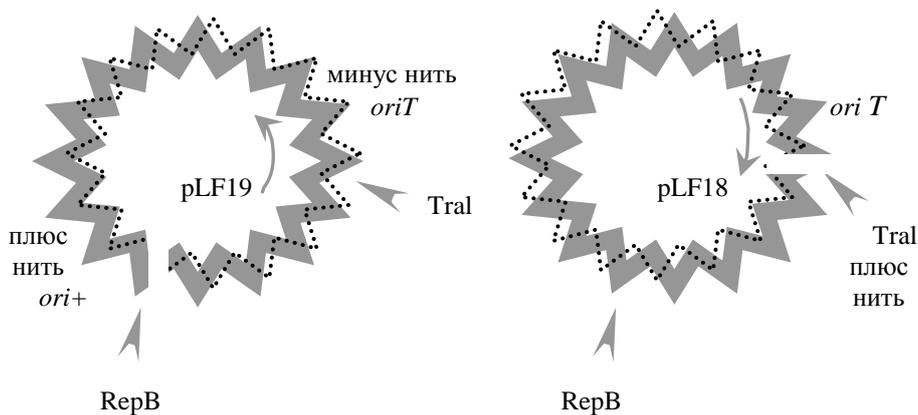


Рис. 3. Модель одновременной инициации вегетативной и конъюгативной репликации, иницируемой однонитевыми разрывами плазмидной ДНК.

Косвенное свидетельство эффективности рестрицирующего воздействия RP4 представляет высокая частота образования коинтеграторов RP4::pLF18 в штаммах *recA⁻*. Можно предполагать, что в отсутствие системы общей рекомбинации, образование коинтеграторов индуцируется разрывами, вносимыми в ДНК белком TraI, кодируемым RP4.

Пригодность плазмид pLF18 и pLF19 для проведенных сравнений вытекает из того, что они изогенны, то есть имеют идентичный набор генетических маркеров и отличаются только ориентацией фрагмента *oriT*. В частности, кодирующая и промоторная области гена *cat* у них идентичны. Таким образом, предположение о том, что концентрация хлорамфениколацетилтрансферазы, от которой зависит рост клеток на среде с хлорамфениколом, пропорциональна копийности плазмид в клетке, вполне обосновано. Тем не менее, наблюдается более медленный рост штаммов с pLF18 также и в отсутствие RP4. По-видимому, *oriT* способна влиять на соседние участки и без связывания с релаксирующим комплексом белков RP4. Область *oriT* перекрывается с дивергентными промоторами генов *traJ* и *traK*, и транскрипция фланкирующих областей может выступать в качестве одной и возможных причин эффекта положения. В частности, такой транскрипт мог бы действовать как антисмысловая мРНК, непосредственно связывающаяся в клетке с *cat* мРНК и снижающая эффективность ее трансляции. Нельзя исклю-

чить и косвенного влияния *oriT* на экспрессию гена *cat* или эффективность репликации плазмиды (например, через эффективность конверсии одноцепочечного интермедиата). Однако эти обстоятельства не ставят под сомнение факт интерференции мобилизуемых вариантов pLF и RP4.

Таким образом, вегетативная репликация плазмид, направленная на их поддержание и стабильное наследование в клетках бактерий, и конъюгативная репликация, направленная на колонизацию новых хозяев, находятся в сложной взаимосвязи. Иногда эти процессы вступают в противоречие и ведут к нарушениям в стабильном наследовании плазмид. Весомый вклад при этом вносит асимметричность синтеза ДНК при репликации по механизму катящегося кольца. Эти наблюдения проясняют причину преобладания тэта-механизма в вегетативной репликации истинных конъюгативных плазмид. Плазмиды же, вегетативная репликация которых происходит по механизму катящегося кольца, как правило, не имеют собственной, постоянно работающей, системы конъюгации, а используют в природе конъюгативные плазмиды-мобилизаторы, с которыми изредка оказываются в одной клетке. Хотя *oriT*/*RS_A* сайты растространены у таких плазмид, кодирование их геномами релексирующего белка представляет большую редкость (11). Некоторые обнаруженные детали структурной организации, в частности, относящиеся к взаимной ориентации областей начала вегетативной и конъюгативной репликации, влияют на репликацию плазмид и физиологию несущих их бактериальных клеток и могут быть полезны при конструировании искусственных рекомбинантных молекул.

Авторы благодарны С. Гронскому, помогавшему в проведении экспериментов, и В.А. Лившицу за всестороннюю помощь. Работа финансировалась из средств госбюджета, Российского фонда фундаментальных исследований и программы «Приоритетные направления генетики».

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleshin V.V., Semenova E.V., Doroshenko V.G., Jomantas Y.V., Tarakanov B.V., Livshits V.A. The broad host range plasmid pLF1311 from *Lactobacillus fermentum* VKM1311. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 178: 47-53.
2. Horinouchi S., Weisblum B. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.*, 1982, 150: 815-825.
3. Simon R. High frequenc mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-mob transposon. *Mol. Gen. Genet.*, 1984, 196: 413-420.
4. Алёшин В.В., Дорошенко В.Г., Тараканов Б.В. 3'-конец гена *repB* лактобациллярной плазмиды pLF1311 удлинился вследствие утраты стоп-кодона гена-предшественника. *Молекулярная биология*, 1998, 32, 3: 416-419.

5. Алёшин В.В., Тараканов Б.В. Новые мобилизуемые векторы семейства рLF1311 для молочнокислых бактерий, несущие *nic* сайт RP4 с различными флангами. В кн.: Современные проблемы биотехнологии продуктивных животных, ВИФП, Боровск, 1999: 106-115.
6. Алёшин В.В., Семёнова Е.В., Тараканов Б.В., Лившиц В.А. Семейство челночных векторов для молочнокислых и других грамположительных бактерий, основанных на репликоне плазмиды рLF1311. *Микробиология*, 2000, 69, 1 (в печати).
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
8. Румер Л.М. Изучение процессов генетического обмена у молочнокислых стрептококков. Дисс. ... к.б.н. М., 1993.
9. Trieu-Cuot P., Carlier C., Poyart-Salmeron C., Courvalin P. Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a LacZ gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *Gene*, 1991, 102: 99-104.
10. Pansegrau W., Lanka E. Mechanisms of initiation and termination reactions in conjugative DNA processing: independence of tight substrate binding and catalytic activity of relaxase (TraI) of IncPa plasmid RP4. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 13068-13076.
11. Guzmán L.M., Espinosa M. The mobilization protein, MobM, of the streptococcal plasmid pMV158 specifically cleaved supercoiled DNA at the plasmid *oriT*. *J. Mol. Biol.*, 1997, 266: 688-702.

**ПИЩЕВАРЕНИЕ, ОБМЕН ВЕЩЕСТВ
И ВОСПРОИЗВОДСТВО У ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ ОБМЕНА АЗОТА И
АМИНОКИСЛОТ В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОМ ТРАКТЕ ЖВАЧНЫХ И
НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ
АМИНОКИСЛОТАМИ ИХ ОРГАНИЗМА ИЗ КОРМОВ РАЦИОНА**

Е.Л. Харитонов, А.М. Материкин, Н.Д. Мысник
Лаборатория пищеварения

В опытах на жвачных животных изучали влияние состава основных протеиновых фракций различных кормов на показатели растворимости и распадаемости протеина в рубце. Приводятся данные об аминокислотном составе фракций протеина и скорости распада нерастворимой распадаемой фракции. Показана зависимость этих показателей от степени инокулирования инкубированных образцов рубцовыми бактериями. Обосновывается способ расчета количественного поступления кормового протеина в тонкий кишечник. Рассматриваются вопросы аминокислотного метаболизма в пищеварительном тракте. Изучена зависимость аминокислотного состава бактериальной фракции содержимого рубца от факторов кормления. Делается вывод о низком варьировании содержания отдельных аминокислот в этой фракции. Приводятся данные о скорости распада аминокислот из нерастворимой распадаемой фракции. Описывается метод расчета поступления аминокислот с нераспавшимся протеином в тонкий кишечник. Изучена зависимость «переваривания» отдельных кормовых аминокислот в тонком кишечнике от степени их распада в преджелудках. На основе полученных данных рассчитано всасывание аминокислот из отдельных кормов в пищеварительном тракте. Полученные данные позволяют рассчитывать количественное поступление протеина и аминокислот из преджелудков жвачных и всасывание кормовых аминокислот в кишечнике, что является необходимым для определения потребностей и обеспеченности жвачных в аминокислотах в рамках разрабатываемой системы питания, основанной на принципах субстратного обеспечения метаболизма.

Введение

Разработки последних двух десятиков лет в области создания новых систем питания были сосредоточены на проблемах протеинового

питания. Показатель распадаемости сырого протеина кормов в рубце являлся основополагающим для всех этих систем. Основываясь на этом показателе во многих странах мира были разработаны и введены в практику кормления прогрессивные системы протеинового питания высокопродуктивного крупного рогатого скота (ARC-84, NRC, INRA). Была создана подобная система и в нашей стране (7, 8). Однако после разработки этих систем интенсивность исследований была значительно снижена и многие вопросы остались мало проработанными. Тем не менее за этот период было накоплено много данных, которые позволяют в настоящее время совершенствовать указанные системы. Одной из главных проблем оставалась разработка подходов к определению не только общего количества всасывающихся аминокислот из пищеварительного тракта жвачных, но и их соотношения. Попытки создать такой подход были предприняты (2), но не получили должного развития. Постановка новой задачи по разработке систем питания, основанных на новых принципах оценки кормов и нормирования рационов для молочных коров по количеству субстратов и метаболитов, потребовала дополнительных данных о количестве образуемых субстратов из рациона и отдельных кормов. Одним из важнейших субстратов для жизнедеятельности и продуктивности животных являются аминокислоты, основным местом всасывания которых является кишечник. Потребность в аминокислотах обеспечивается за счет переваривания белков, которые поступают в кишечник из сложного желудка. Для расчета и прогнозирования поступления аминокислот из кишечника в метаболический фонд организма необходимо иметь данные о переваримости и аминокислотном составе всех фракций протеина, поступающих из желудка. Поступление кормового протеина в кишечник зависит от распадаемости его в рубце, а всасывание от переваримости и аминокислотного состава нераспавшегося протеина отдельных кормов. Исследования по данному вопросу удовлетворительно эту проблему не решили. В литературе имеются довольно противоречивые данные как об аминокислотном составе нераспавшегося протеина, так и о степени переваривания отдельных аминокислот в кишечнике.

Таким образом, в задачи исследований входило: изучить аминокислотный состав протеиновых фракций основных белковых кормов; изучить зависимость аминокислотного состава нераспавшейся фракции протеина отдельных кормов от степени ее распада в преджелудках; изучить зависимость «переваримости» отдельных аминокислот нераспавшейся фракции протеина в рубце от степени их распада.

Материал и методы

Исследования проведены на первотелках холмогорской породы, средней живой массой 435 кг. Животным были оперативным путем на-

ложены фистулы рубца и двенадцатиперстной кишки. Распадаемость протеина отдельных кормов в рубце определяли методом *in sacco* (5). Переваримость нераспавшегося протеина и освобождение отдельных аминокислот при гидролизе изучали методом мобильных мешочков (21). Бактериальные и протозойные фракции были выделены методом дифференциального центрифугирования (5) из содержимого рубца. Коров содержали на сено-свекольно-концентратном рационе. Аминокислотный состав фракций белка определяли на аминокислотном анализаторе после предварительного гидролиза.

Результаты и обсуждение

Источниками для удовлетворения потребностей жвачных животных в аминокислотах служат кормовые и микробные белки, перевариваемые в тонком кишечнике. Определяющим моментом в количественном аспекте этого процесса является распад протеина корма в преджелудках.

Распадаемость протеина корма в преджелудках и факторы ее определяющие.

В настоящее время процесс распада сырого протеина (СП) принято считать трехфакторным, зависящем от физико-химических свойств самого протеина, активности рубцовой микрофлоры и скорости эвакуации содержимого из преджелудков. Исходя из физико-химических свойств протеинов кормов, предложено много классификаций кормовых белков. Наиболее известна классификация Осборна, основанная на растворимости белков в растворителях различной природы. Во многих работах приводятся данные о составе белковых фракций кормов по этой классификации. Обращает на себя внимание относительно большой разброс и непостоянство количественного состава отдельных фракций. Так у злаковых соотношение проламинов и глютелинов может меняться, довольно лабильна альбуминовая фракция. Так же имеет значительные колебания в количественном отношении недоступная часть азота. Было сделано предположение, что отдельные протеиновые фракции из разных кормов имеют относительно постоянную скорость распада в рубце (18). У бобовых основной вид белков – глобулины, однако по нашим данным белок сои распадается со значительно меньшей интенсивностью (0,06 ед/час), чем белок гороха (0,16 ед/час). Проламины кукурузы значительно устойчивее проламинов пшеницы. При рассмотрении состава отдельных фракций видно, что и они состоят из более мелких отдельных групп белков. И это соотношение так же варьирует. Чем больше в составе фракции белков с меньшей молекулярной массой, тем больше возможности для ее разрушения микробными протеолитическими ферментами. Несмотря на

это появилась новая классификация, представляющая конгломерат системы Осборна и Ван-Соеста (17, 23), основанная уже не на использовании классических растворителей Осборна, а на использовании детергентов Ван-Соеста. В результате последовательной обработки получают растворимый протеин (альбумины, часть глобулинов), протеин, растворимый в нейтральном детергенте (проламины, глобулины, глютелины), протеин, растворимый в кислом детергенте (протеин связанный с клетчаткой, продукты реакции Мейларда) и недоступный протеин при обработке 72% серной кислотой (протеин связанный с лигнином). Анализ основных кормов по этой системе показал, что по унификации и простоте эта система заслуживает внимания, но допущение, что каждой фракции протеинов присваивается определенная скорость распада, вызывает сомнение по уже названным причинам. Рассматривая распадаемость даже самой простой фракции, растворимой в воде (или альбуминов), невозможно дать полную физиолого-биохимическую характеристику процесса ее переваривания. Так в наших опытах отмечена скорость распада растворимой фракции соевого шрота – 50% в час, подсолнечного – 200 %/ч, гороха – 300 %/ч. В то же время существуют растворимые белки, вообще не подверженные ферментативному гидролизу.

На стандартном рационе при содержании СП 1,5кг, при изменении скорости распада растворимой фракции с 20 до 1000% в час, поступление аминокислот в двенадцатиперстную кишку снижается с 96 до 3,3 г, что в общем потоке составляет 6,4 и 0,22%. По-видимому, не стоит проводить специальных исследований для определения скорости переваривания в рубце растворимой фракции из разных кормовых источников. Вполне достаточно будет применять средние данные, с учетом их коррекции при использовании экзотических рационов.

Рассматривая самые крупные протеиновые фракции – глобулиновые для бобовых и масличных и проламиновые для злаковых видим такую же картину. Общее среднее значение скорости распада для отдельных фракций однозначно принять невозможно. Даже определив эти значения для отдельных кормов, нельзя гарантировать их постоянства. Скорость распада шротов сильно зависит от технологических режимов, применяемых на различных маслоперерабатывающих заводах. В результате для соевого шрота в разные годы на сходных рационах получали сильно различающиеся цифры – 0,02-0,06 ед/час, а для подсолнечного – 0,18-0,06 ед/час. Для зерна злаковых наблюдалась такая же картина. Так скорость распада СП пшеницы варьировала от 0,08 до 0,30 % в час. Это зависело как от сорта зерна, так и от режимов его уборки и хранения.

Попытки соотнести распадаемость глобулинов из разных кормов с их аминокислотным составом к достоверным закономерностям не

привели. Учитывалось соотношение суммы заменимых и незаменимых аминокислот, отношение пролина к сумме лизина и аргинина, количество аминокислот, имеющих дополнительные функциональные группы. Однако коэффициенты корреляции, по нашим данным, были не велики. Так зависимость распада протеина отдельных кормов от соотношения пролина к сумме аргинина и лизина была не выше $r = 0,3$, а зависимость переваривания протеина в кишечнике натуральных кормов без предварительной обработки в рубце была выше $r = 0,96$. По мере возрастания степени предварительного гидролиза в преджелудках зависимость снижалась до 0,47. Аналогичная закономерность прослеживается и при анализе зависимости переваривания и распада от наличия функциональных групп.

Таким образом, способность белков к перевариванию в рубце и кишечнике определяется целым рядом факторов: соотношением входящих в него фракций, их молекулярной массой (дисперсностью), аминокислотным составом, физическими характеристиками подготовки корма к перевариванию (величина частиц), связанностью белков с другими питательными веществами корма (в первую очередь структурными углеводами) и др.

Анализ графиков распада протеина для разных кормов показывает, что распадаемая часть состоит минимум из двух фракций, так как выделяются два участка с разным наклоном кривой к оси абсцисс. Это говорит о том, что в распадаемой фракции присутствуют два вида белка, ферментирующиеся с разными скоростями. Это подвигло ряд исследователей на создание очередной классификации на основе разных скоростей распада отдельных фракций СП кормов (17). Так СП кормов делят на медленно, средне и быстро распадаемые фракции, которые выявляются при математическом анализе графиков распада. Меняются ли эти скорости, изменяется ли соотношение составляющих фракций – это в данной работе не оговаривается. Между тем нами замечено, что не всегда на графике распада, например, СП ячменя выделяются две составляющие.

Проведенный анализ существующих классификаций кормовых белков с позиций характеристики процесса распада показал, что новые разработки по этому вопросу значительно продвинули наши знания в понимании характеристики белков по их способности к распаду в преджелудках. В то же время, знания скорости распада каждой фракции нужны скорее для селекционной работы с сортами растений, для тонких объяснений процесса распада, интерпретации данных, описания кривой распада. Тем не менее, знание действительной средней скорости распада всего распадаемого СП дает те же величины по степени распада, что и расчет с учетом содержания отдельных фракций и их скорости распада. По-видимому, на настоящий момент достаточно использовать в системах питания для расчета распадаемого СП кормов

рациона средние данные о содержании только растворимой и нерастворимой распадаемой фракций и скорости их распада. Существующий разброс данных в скоростях распада СП из отдельных кормов существованием нескольких отдельных более мелких фракций или изменением их соотношения объяснить не удастся. Изменения соотношения невелики и разница в скорости распада медленной и быстрой фракций незначительна. По-видимому, в таких случаях основной вклад в разброс данных вносит ферментативная активность рубцовой микрофлоры, которая может быть обусловлена разным составом рациона.

Наибольшее влияние на скорость распада СП кормов в рубце может оказывать состояние его микрофлоры. Скорость распада представляется в таком случае суммарным результатом деятельности рубцовой микрофлоры. Причем, процесс распада СП будет определяться не только протеолитической активностью рубцовой микрофлоры, но и ее целлюлозолитической активностью, что характерно, в первую очередь, для белков растительного происхождения, у которых белок представлен структурно или пространственно связанным с углеводно-лигнинным комплексом растительной клетки. В результате этого клеточные стенки растений представляют собой барьер для действия протеолитических ферментов. Изучение факторов, определяющих активность микробов в переваривании белков, клетчатки и крахмала с помощью классических методик не привело к окончательным результатам. Было установлено, что амилолитическая и целлюлозолитическая активности рубцовой микрофлоры находятся в обратной зависимости, а из кормовых факторов значение имеет отношение концентрированных и грубых кормов в рационе. Одним из действующих факторов является показатель рН. Однако, в связи с довольно большой искусственностью методов определения активности, когда в качестве субстратов применяются или слишком доступные вещества – растворимый крахмал для амилолитической, казеин или гемоглобин для протеолитической активности, получаются слишком высокие значения, которые находятся в недостаточно чувствительной области и в результате слабо реагируют на изменяющиеся условия кормления и содержания.

Применение в качестве субстратов натуральных кормов в сочетании с методом синтетических мешочков, позволяет получать более естественные значения скоростей распада. В этом случае полученные значения отражают общий результат ферментативной активности микрофлоры. Между активностью микробов и перевариванием в мешочках связь проявляется слабо. Но при инкубации изменения в скорости распада питательных веществ кормов более выражены при изменении кормовых факторов. Хотя так же трудно установить первопричину происшедших изменений. Увеличение скорости распада СП может происходить в результате увеличения количества определенного класса микробов, изменения удельной активности протеолитических или цел-

люлолитических бактерий. Когда увеличения количества микробов не происходит, а возрастает только удельная активность, это может быть связано, в первую очередь, с изменением соотношения видов микробов (при изменении условий питания) или изменением соотношения штаммов внутри вида. Это происходит при увеличении скорости эвакуации, когда для выживания требуются микробы со скоростью роста не меньше скорости оттока. Это могут быть отдельные штаммы, а что более вероятно, изменяется в популяции соотношение молодых и старых клеток. Известно, что более молодые культуры растут и размножаются более интенсивно, чем старые. Это в определенной мере можно отнести и к непрерывно функционирующим культурам, к которым и относится микробное сообщество в преджелудках. Методический подход к описанию этих взаимоотношений ещё не найден. На обобщенном уровне эта взаимосвязь находит отражение для некоторых кормов (ячмень, кукуруза) в прямой зависимости от скорости эвакуации отдельных фракций содержимого из преджелудков (13).

В принципе, это рассуждение представляет собой частный случай общебиологического закона соморегуляции биологических систем, когда происходит коррекция процессов, протекающих не в экстремальных режимах. Но полной компенсации не происходит. Часто наблюдается скачкообразный характер изменения скорости распада от скорости оттока. Это происходит в силу инерционности системы, разноуровневого подключения компенсаторных механизмов. При небольших изменениях в оттоке меняется соотношение внутри вида молодых и старых клеток, затем штаммов. Когда интенсивность роста вида всё равно не успевает за оттоком, происходит скачкообразная смена вида. Его $K_{\text{роста}}$ может быть уже выше $K_{\text{оттока}}$ и общая распадаемость может быть выше исходной. Но данных для детального описания еще явно недостаточно. На данном этапе нужно ограничиться применением средних значений скоростей распада с их коррекцией на скорость эвакуации и соотношение концентрированных и грубых кормов в рационе. Таким образом процесс распада протеина в рубце довольно полно описывается следующим уравнением:

$$P = (A+B)C/(C+K),$$

где P – распадаемость (%), A – растворимая часть протеина(%), B – нерастворимая доступная часть(%), C – скорость распада фракции B (ед/час), K – скорость оттока кормовых частиц из рубца (ед/час).

Такое уравнение позволяет вести расчет распадаемости СП как отдельных кормов, так и всего рациона при суммировании всех кормовых источников. Данные по фракционному составу основных кормов и скорости распада приведены в табл. 1. Скорость эвакуации предлагается оценивать по предложенному нами ранее методу (12). В настоящее время нами накоплен значительный материал о фракционном составе,

распадаемости и переваримости протеина широкого спектра кормов (зерно злаков, бобовых, шроты, грубые корма, корнеплоды). Эти данные являются основой для расчета распадаемости протеина отдельных кормов в рубце и протеина всего рациона (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика протеина кормов с позиций распадаемости

Корм	Растворимая фракция протеина (А), %	Распадаемая фракция протеина (В), %	Недоступная часть, 100-(А+В)	Скорость распада фракции В,(С) ед./час
Пшеница	25	70	5	0,13
Ячмень	15	80	5	0,07
Кукуруза	15	75	10	0,025
Соевый шрот	20	75	5	0,025
Соевый шрот нетостированный	20	75	5	0,042
Подсолнечный шрот	45	50	5	0,14
Горох	40	55	5	0,10
Кормовые бобы	10	85	5	0,18
Рапс	35	60	5	0,05

Такой подход был нами обоснован экспериментальными данными по поступлению фракций протеина в кишечник и получены хорошо сопоставимые с расчетными данными результаты как в опытах на овцах (15), так и на коровах (отчет лаб. пищ., 1998г). В настоящее время такой подход может быть применен в качестве основного элемента и при определении образования других субстратов в пищеварительном тракте жвачных животных. Данная формула находит применение и для расчета переваривания в рубце структурных и неструктурных углеводов. Описанный подход применим для расчета метаболических преобразований отдельных аминокислот в пищеварительном тракте.

Вторым важным источником аминокислот, поступающих в дуоденум, является бактериальный и протозойный белок. В настоящее время принято считать, что содержание аминокислот в названных белках относительно постоянно и мало зависит от типа кормления и состава рациона животных (6, 9). Однако в этих же работах было показано, что отдельные группы микроорганизмов имеют неодинаковый аминокислотный состав и, таким образом, факторы кормления, вызывающие изменение соотношения между отдельными группами микроорганизмов, могут приводить к определенным сдвигам спектра аминокислот. Простейшие имеют обычно больше незаменимых аминокислот в основном за счет лизина, лейцина, тирозина и фенилаланина. Тараканов Б.В. с соавт. (9) обнаружили, что аминокислотный состав отдельных видов молочнокислых бактерий существенно отличается от аминокис-

лотного состава белка суммарных фракций бактерий и простейших рубца овец. Анализ аминокислотного состава фракций бактерий и простейших, выделенных из рубцового содержимого овец, содержащихся на различных рационах, в целом подтвердил указанное положение. Аминокислотный индекс белка простейших был значительно выше такового белка бактерий (1,32 против 1,07; $P < 0,05$) в основном за счет большего относительного содержания в простейших таких незаменимых аминокислот, как изолейцин, лейцин, лизин и фенилаланин, и меньшего – заменимых аминокислот – аланина и глицина. Таким образом, изменение соотношения бактериального и протозойного белка, поступающего в кишечник, может приводить к сдвигам в аминокислотном составе химуса. Между тем, аминокислотный состав самих фракций бактерий и простейших, выделенных из содержимого рубца коров, по имеющимся данным, имеет незначительные колебания (2, 7). При содержании овец на различных рационах, охватывающих различия в уровне потребления сухого вещества, протеина, клетчатки и формы грубого корма, нами были получены сходные данные. Соотношение аминокислот во все периоды опыта различалось незначительно. Заметно больше содержалось в бактериях, выделенных при скармливании сеной муки, аргинина (7,5% против 4,8% в среднем, $P < 0,05$), а при изменении качества грубого корма – лизина (8,1 против 6,3) (табл. 2). На этих рационах отмечены и наибольшие аминокислотные индексы белка бактерий – 1,29 и 1,13 против 1,07 в среднем. По остальным аминокислотам колебаний во фракциях бактерий не обнаружено.

Для получения корректных результатов в опытах по определению распадаемости протеина методом инкубации *in sacco* следует учитывать возможное загрязнение кормовых остатков бактериями. По данному вопросу в литературе еще не сложилось определенного мнения. Как указывает в своей книге Ерсков (3), белок бактерий составляет менее 1% от содержания общего протеина, оставшегося в мешочках после инкубации. Однако другие исследователи показывают (19), что на долю бактериального азота в кормовых остатках после инкубации может приходиться от 6 до 25%. Исследования остатков кормов на содержание ДАПК (диаминопимелиновая кислота) в наших опытах показали, что на долю бактериального азота приходится от 2 до 15% азота микробов, а относительно остаточного азота – от 4 до 30% (табл. 3). Причем, при инкубации концентрированных кормов процент был минимальным (2-4), а сена – 20-30%. По-видимому, это обусловлено различиями в группах бактерий, которые преимущественно ферментируют тот или иной субстрат. Грубые корма, в основном, разрушают целлюлозолитические бактерии, которые об-

ладают сильно выраженными адгезивными свойствами (21). Концентрированные корма ферментируются амилолитическими бактериями, слабо прикрепляющимися к кормовым частицам (21). В результате на показатель распадаемости СП концентратов бактериальное загрязнение не оказывает заметного влияния. Коррекция на содержание микробного азота в таких кормах изменяет показатель распадаемости всего на 1-3%. Для грубых кормов такая коррекция более существенна – 10-15%. По-видимому, этот факт должен быть принят во внимание при получении данных, характеризующих процесс распада протеина корма.

Таблица 2. Аминокислотный состав фракции рубцовых бактерий

Аминокислоты	Характеристика рационов, %							В среднем	Станд. отклонение
	СП 9	СП 12,2 НДК 43,8	СП 14,2	СП 12,2 НДК 50	СП 12,2 НДК 55,6	СП 12,2 НДК 43,8 сenn. мука	СП 12,2 НДК 43,8 сена 50 сenn. муки		
Лизин	5,9	6,7	6,6	8,1	6,2	5,8	5,6	6,5	0,36
Гистидин	5,2	4	3,5	3,5	4,2	6	4,9	4,4	0,35
Аргинин	4	4	4,2	5,4	3	8,5	3,7	4,6	0,69
Аспаргат	12,2	11,5	12,4	11,5	11,2	12,7	12,3	11,9	0,21
Треонин	5,9	5,5	6,2	6	5,4	6,4	6,1	5,9	0,13
Серин	4,3	4,2	4,5	4,2	3,7	4,7	4,3	4,2	0,11
Глутамат	12,1	11,1	12,2	12,1	11,1	13,6	12,6	12,1	0,32
Глицин	9,4	8,5	9,7	8,3	9,4	8,2	9,2	8,9	0,22
Аланин	6,3	5,8	6,2	6,3	5,8	5,1	7,1	6,08	0,23
Цистин	2	1,6	2,2	2,4	1,2	3,3	1,1	1,9	0,28
Валин	4,9	4,8	4,9	4,9	5,6	5,6	5,5	5,1	0,14
Метионин	3,6	3,5	3,3	3,2	4,3	3,5	3,5	3,5	0,13
Изолейцин	4,7	4,8	4,3	5,1	5,1	4,3	4,3	4,6	0,13
Лейцин	9,5	9,4	9,7	9,4	9,9	9,2	8,1	9,3	0,21
Тирозин	2,4	3,8	2,7	2,8	5,4	3,3	1,7	3,1	0,44
Фенилалан.	6,9	7,6	7,3	7,5	8,1	7,2	8,6	7,6	0,21

Таблица 3. Содержание бактериального азота в остатках кормов после 8-часовой инкубации в рубце овец

Показатели	Шрот подсолнечный	Ячмень	Овес	Сено
ДАПК, мМ	0,088	0,022	0,040	0,057

Азот бакт., мг в 100 мг СВ	0,55	0,13	0,23	0,33
% азота бактерий в остатке от исходного азота	4,2	2,0	3,9	19,7
% азота бактерий от остаточного количества азота в образце	13,2	4,2	26,9	23,3

В настоящее время существуют несколько подходов к определению аминокислотного состава химуса, поступающего в кишечник, как на основе расчета синтеза микробного белка и постоянства состава нераспавшегося протеина отдельных кормов (2), так и на основе выведения уравнений регрессии (6а, 20). Однако, несмотря на высокие коэффициенты регрессии, данные уравнения могут успешно работать только в условиях, аналогичных данному эксперименту и, как правило, степень их прогностической ценности резко снижается при переносе на другой массив данных. Для проработки данного вопроса нами были проведены опыты по анализу аминокислотного состава основных белковых фракций, их распадаемости и переваримости по схеме, которую мы применяли при изучении метаболизма протеина.

Данных об аминокислотном составе протеиновых фракций, распадаемости и переваримости отдельных аминокислот из различных кормов недостаточно. В связи с этим нами были взяты для исследования корма с высоким содержанием белка, вносящие существенный вклад в азотистый метаболизм.

Аминокислотный состав фракций протеина, их распадаемость и «переваримость». В результате анализа семян гороха, рапса, подсолнечного и соевого шрота установлен фракционный состав протеина и аминокислотный состав его фракций. Больше всего растворимого протеина было в подсолнечном шроте, далее идет горох и рапс. Меньше всего растворимой фракции было в соевом шроте. Такая же зависимость установлена для заменимых и незаменимых аминокислот и их суммы (табл. 1, 5). Нерастворимая распадаемая фракция протеина и аминокислот установлена как наибольшая для соевого шрота. Процент аминокислот в этой фракции у других кормов был примерно одинаков. В процентном отношении больше аминокислот в недоступной фракции выявлено у рапса, затем следует подсолнечный шрот. Для соевого шрота и гороха эта фракция была примерно одинакова.

Применение такого подхода продиктовано тем, что предлагавшиеся до этого системы расчета поступления кормовых аминокислот в кишечник (2) исходили из данных о постоянстве состава нераспавшейся части протеина корма. Наши данные показали, что состав этой фракции может иметь значительные вариации в зависимости от сроков инкубации в рубце. При изменениях распадаемости протеина данного корма, связанных с влиянием рубцовой среды, будут наблю-

даться вариации не только в валовом поступлении, но и в соотношении аминокислот (табл. 4).

Как видно из полученных данных, происходит, на первый взгляд, незакономерное изменение аминокислотного состава нераспавшейся части протеина кормов. Однако, происходящие процессы легко объясняются, если рассмотреть аминокислотный состав основных фракций протеина (табл. 5).

Таблица 4. Аминокислотный индекс нераспавшейся фракции протеина кормов

Время инкубации, час	Горох	Подсолнечный шрот	Соевый шрот	Рапс
7	1,01	0,91	0,85	1,17
16	1,3	0,77	0,89	0,98
24	0,98	0,86	0,84	1,02

Таблица 5. Аминокислотный состав протеиновых фракций

Показатели	Горох	Подс. шрот	Соев. шрот	Рапс
Сумма ам-к в нат. корме, г	20,2	29,5	42,6	15,4
Раств. фракция %				
% нез. амин.	35,0	33,6	13,0	23,3
% зам. амин.	42,2	47,2	15,1	36,3
% суммы	38,7	43,1	14,2	30,4
Нераств. распад. %				
% нез. амин.	63,5	67,0	85,0	68,9
% зам. амин.	56,9	42,5	84,5	56,6
% суммы	60,0	53,0	84,8	62,5
Недоступн. фракция %				
% нез. амин.	1,5	5,1	1,3	6,8
% зам. амин.	0,9	2,7	1,4	7,5
% суммы	1,2	3,7	1,3	7,2

Растворимая фракция протеина всех изученных кормов содержала большее количество заменимых аминокислот по сравнению с незаменимыми и имела наименьший аминокислотный индекс. Анализ растворимой фракции на содержание белкового и небелкового азота показал, что весь небелковый азот переходит в растворимую фракцию и отношение белкового к небелковому азоту в нативном корме и растворимом протеине значительно изменяется. Нерастворимая распадаемая фракция протеина имеет большее содержание незаменимых аминокислот и занимает самый большой удельный вес у большинства кормов. Недоступная фракция протеина содержит наибольшее процентное содержание незаменимых аминокислот, но удельное ее содержание самое низкое. Эти данные являются исходными для анализа изменений содержания отдельных аминокислот по ходу распада протеина. Анализ

нераспавшихся остатков корма после инкубации обычно сравнивают с их исходным содержанием в нативном корме, в результате чего разные авторы получают самые различные результаты. Одни утверждают, что аминокислотный состав по ходу ферментации не изменяется (4, 16), другие находят довольно значительные изменения (1). Это происходит как из-за разной конечной степени распада, так и из-за непостоянства фракционного состава одних и тех же кормов. На наш взгляд для более правильной интерпретации полученных данных следует производить сравнение аминокислотного состава с содержанием нераспавшейся части протеина в исходной фракции, а не от общего первоначального содержания.

Проведенные исследования показали, что растворимая часть протеина кормов имеет низкое содержание незаменимых аминокислот. С учетом их высокой скорости дальнейшей ферментации, состав растворимых белков не вносит существенного вклада в общее количество и состав аминокислот, поступающих в 12-перстную кишку. Его следует учитывать при проведении мероприятий по снижению их растворимости. Недоступная часть белков хотя и имеет высокий процент содержания незаменимых аминокислот, но, принимая во внимание невысокое их содержание и слабое переваривание в кишечнике, не стоит предпринимать меры по повышению их доступности. Особое внимание следует уделять нерастворимой распадаемой фракции, которая может достигать до 80% у отдельных аминокислот для соевого шрота (треонин, аргинин, метионин), у других кормов 50-70% (горох, подсолнечный шрот, рапс).

Полученные данные об аминокислотном составе следует рассматривать с существующих позиций о процессе распада протеина во время его рубцовой ферментации. При таком подходе видно, что увеличение аминокислотного индекса в ранние сроки инкубации происходит из-за удаления растворимой части протеина, имеющей высокое содержание заменимых аминокислот. В дальнейшем происходит постепенное его снижение из-за большей скорости распада незаменимых аминокислот. При больших значениях показателя распадаемости СП аминокислотный индекс начинает возрастать из-за увеличения доли недоступной части СП, имеющей высокое количество незаменимых аминокислот. Таким образом, очевидно, что применение определенных значений содержания отдельных аминокислот в нераспавшейся части СП не всегда отражает их истинное количество и при применении в практике кормления может приводить к неадекватным значениям. Этого позволяет избежать предлагаемый нами метод расчета поступления нераспавшихся кормовых аминокислот, основанный на принципах, апробированных в применении к протеину, а именно на учете динамики распада отдельных аминокислот и их содержания в различных фракциях СП.

Для прогнозирования поступления доступных аминокислот в составе нерастворимой распадаемой фракции протеина необходимо знать скорость распада отдельных аминокислот. Она определяется как соотношением основных белковых фракций (глобулины, проламины, глютелины), так и специфичностью действия ферментов на отдельные пептидные связи. Рубцовые протеазы – цистинового типа, т.е. имеют широкий спектр воздействия на разнообразные связи. Микробные протеазы обладают более широкой субстратной специфичностью по сравнению с протеолитическими ферментами животных и растений. Изучение распада отдельных аминокислот в рубце показало, что незаменимые аминокислоты распадаются более интенсивно (табл. 6, 7).

Скорость распада протеина и аминокислот в рубце из нерастворимой распадаемой фракции была наибольшей для соевого шрота и наименьшей для подсолнечного. Основываясь на приведенных данных по аминокислотному составу фракций протеина кормов, скорости распада отдельных аминокислот из нерастворимой распадаемой фракции и скорости эвакуации кормовых частиц из преджелудков, можно рассчитать поступление кормовых аминокислот в кишечник. Для расчета всасывания кормовых аминокислот требовалось изучить зависимость их «переваривания» в тонком кишечнике от степени предварительного распада в преджелудках. Ранее нами установлена зависимость (параболическая) переваривания протеина в кишечнике от степени его распада в преджелудках (10). Такая же зависимость наблюдается и для отдельных аминокислот (табл. 8), и для суммы аминокислот указанных кормов.

«Переваримость» незаменимых аминокислот с увеличением распадаемости протеина снижается для рапса существенно, меньше для подсолнечного шрота и гороха и возрастает для соевого шрота. «Переваримость» заменимых аминокислот снижается у рапса и подсолнечного шрота и возрастает для гороха и соевого шрота.

По способности к «перевариванию» отдельных аминокислот в кишечнике трудно выявить особенности действия протеолитических ферментов кишечника, так как на этот процесс влияет и степень предварительного гидролиза данной аминокислоты в рубце. Сохраняя общий вид зависимости «переваривания» аминокислоты от степени ее распада в рубце (параболический), разные аминокислоты имеют особый характер кривой, который отличается как по выпуклости, так и по растянутости линии. В кишечнике незаменимые и заменимые аминокислоты «перевариваются» с одинаковой интенсивностью, но по мере возрастания степени их предварительного распада в рубце, «переваримость» незаменимых аминокислот снижается более выражено (из-за высокого содержания незаменимых аминокислот в недоступной части протеина). Таким образом, на настоящий момент не выявлены химические, физиологические и биохимические особенности «перева-

ривания» отдельных аминокислот в кишечнике. Сохраняется только большая интенсивность освобождения незаменимых аминокислот. В тоже время имеющиеся данные о «переваримости» аминокислот в зависимости от степени их распада в рубце, пока без должного обоснования, могут быть использованы для расчета всасывания отдельных аминокислот из кишечника. Использовать данные о переваривании протеина теина и среднем их аминокислотном составе недостаточно,

Таблица 6. Аминокислотный состав белка соевого шрота и его фракций

Аминокислоты	Исходный корм		Растворимая фракция			Нерастворимая фракция			Скорость распада %/час	Недоступная часть		
	% в СВ	% в СП	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва		% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва
Аспарат	5,2	12,2	0,7	10,8	13,5	4,5	12,5	85,6	6,2	0,04	8,9	0,8
Треонин	1,6	3,7	0,1	1,5	6,7	1,4	4,1	91,9	8,8	0,03	5,3	1,7
Серин	2,7	6,4	0,5	7,2	17,2	2,2	6,3	81,8	5,5	0,03	5,4	1,0
Глутамат	8,9	20,9	1,3	20,6	15,1	7,5	21,0	84,0	6,3	0,08	16,2	1,9
Глицин	2,0	4,8	0,2	4,0	12,6	1,7	4,8	85,6	6,8	0,03	7,1	1,7
Аланин	2,1	4,9	0,2	3,8	12,0	1,8	5,0	86,5	7,6	0,02	5,0	1,2
Валин	2,0	4,7	0,2	3,7	11,9	1,7	4,8	87,0	7,3	0,02	4,4	1,1
Метионин	0,6	1,4	0,03	0,5	5,7	0,5	1,5	90,1	11,7	0,02	5,4	2,8
Изо-лейцин	1,8	4,2	0,3	4,8	17,2	1,47	4,1	81,3	5,7	0,02	4,6	1,3
Лейцин	3,9	9,2	0,7	10,5	17,2	3,2	7,0	81,8	5,7	0,04	7,9	1,1
Тирозин	1,9	4,4	0,4	7,0	24,4	1,5	4,4	83,6	4,1	0,04	8,5	2,2
Фен-аланин	2,3	5,4	0,3	4,6	12,9	1,95	5,4	85,7	6,5	0,03	6,0	1,3
Лизин	3,0	7,0	0,4	6,1	13,3	2,57	7,3	85,3	6,5	0,03	6,7	1,6
Гистидин	1,5	3,6	0,38	5,9	25,0	1,13	3,1	73,3	4,4	0,02	4,0	1,3
Аргинин	2,7	6,4	0,13	4,9	4,9	2,59	7,2	94,1	10,0	0,02	4,4	0,7

Таблица 7. Аминокислотный состав фракций белка подсолнечного шрота

Аминокислоты	Растворимый протеин			Нераств. распад. протеин				Недоступн. протеин		
	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва	скор. расп. %/час	% в СВ	% в СП	% от исход. кол-ва
Аспарат	1,19	9,3	39,7	1,7	11,0	57,1	3,2	0,1	9,8	3,5
Треонин	0,57	4,4	41,3	0,75	4,8	53,6	3,1	0,07	3,9	5,6
Серин	0,85	6,6	47,2	0,9	5,7	50,0	2,5	0,05	5,5	3,1
Глутамат	3,26	25,5	50,1	3,11	9,9	47,7	2,4	0,15	14,7	2,3
Глицин	0,71	5,5	40,9	0,97	6,2	55,8	3,0	0,06	6,2	3,6
Аланин	0,96	7,5	48,8	0,97	6,2	49,0	2,4	0,05	4,9	2,6
Цистин	0,42	3,3	64,0	0,25	1,6	7,3	1,3	0,00	0,0	0,0
Валин	0,22	1,7	21,2	0,78	5,0	73,5	5,6	0,06	6,2	5,9
Метионин	0,21	1,6	33,4	0,34	2,1	54,3	3,5	0,07	7,6	12,4
И-лейцин	0,28	2,2	31,2	0,56	3,6	63,0	4,4	0,05	3,9	5,8
Лейцин	0,59	4,6	30,7	1,28	8,2	65,7	4,4	0,08	7,6	4,0
Тирозин	0,53	4,1	47,7	0,54	3,4	50,0	2,4	0,04	3,9	3,6
Фенилалан.	0,32	2,5	26,5	0,86	5,5	70,0	4,9	0,05	4,9	4,3
Лизин	0,23	1,8	20,5	0,80	5,1	71,4	6,1	0,09	8,8	8,6
Гистидин	0,40	3,1	42,8	0,50	3,2	52,6	2,8	0,05	4,9	5,7
Аргинин	1,97	15,4	59,0	1,30	8,3	40,0	2,0	0,06	6,5	2,5
Зам. ам.	7,97	–	47,2	8,46	–	50,2	2,5	0,46	–	2,7
Нез. ам.	4,79	–	37,9	7,17	–	56,8	4,0	0,65	–	5,1
Сумма	12,8	–	43,3	15,6	–	53,0	3,0	1,11	–	3,8
Амин. инд.	0,6			0,84				1,42		

так как аминокислотный спектр переваренных фракций белков может значительно варьировать. Для основных белковых кормов требуется учитывать данные по аминокислотному составу его фракций, скорости распада отдельных аминокислот и «переваривания» их в кишечнике. Нами выявлены некоторые особенности «переваривания» отдельных аминокислот. Так все изученные корма имели, относительно других аминокислот, более низкое освобождение метионина. С увеличением распадаемости у некоторых аминокислот происходило более резкое снижение «переваримости», чем у других (фенилаланин и гистидин для рапса; гистидин, лизин, аргинин для подсолнечного шрота; лизин и аргинин для гороха). С увеличением степени распада метионина у гороха, его «переваримость» линейно возрастала. Для соевого шрота все аминокислоты освобождались со схожей интенсивностью.

Таблица 8. Зависимость «переваривания» аминокислот от степени их распада в преджелудках

Аминокислоты Распа- даемость, % (Р) «Переваримость», % (П)	Рапс			Соевый шрот			Подсолнечный шрот			Горох		
	1	2	3	3	4	5	4	5	5	5	5	
Аспар Р	36.2	71.7	86.8	22.5	31.4	65.8	49.5	67.0	85.2	59.8	90.5	95.8
П	59.9	58.9	27.1	93.4	96.5	97.7	84.2	77.8	76.8	69.7	85.1	86.7
Тре Р	30.1	70.7	85.3	13.3	24.0	60.3	49.6	73.6	83.9	59.0	76.2	94.8
П	60.1	49.7	36.7	92.0	97.0	95.8	84.1	81.0	79.7	65.5	90.4	87.0
Сер Р	31.1	70.7	86.1	25.7	41.4	66.2	56.2	71.0	86.2	45.5	79.3	94.3
П	59.7	50.0	24.6	91.5	96.0	97.2	82.6	77.7	77.5	72.5	89.6	83.2
Глут Р	57.5	82.9	92.4	23.1	43.6	67.8	59.1	75.5	89.1	51.1	89.2	95.6
П	62.7	57.3	30.4	94.3	97.1	97.3	86.1	79.6	79.6	78.5	88.8	84.1
Глиц Р	56.2	75.7	88.9	20.5	37.2	65.3	50.3	65.1	82.8	52.2	74.6	94.2
П	45.5	67.9	27.0	90.4	91.5	95.2	82.5	75.0	75.0	61.3	90.8	68.1
Алан Р	28.8	78.2	90.4	18.4	52.8	66.8	57.7	72.2	86.9	58.9	88.0	95.7
П	53.2	51.6	33.4	90.7	93.8	96.5	83.6	82.0	77.3	73.2	84.2	79.5
Цист Р	30.0	87.5	92.2	-	-	-	69.4	82.4	87.5	-	-	-
П	-	-	-	-	-	93.4	-	58.3	-	-	-	-
Вал Р	30.2	76.5	87.9	19.8	39.1	68.6	28.6	55.7	73.6	51.5	78.1	95.1
П	62.9	64.7	39.7	92.6	96.9	96.8	86.4	79.8	77.9	79.9	89.8	75.8
Мет Р	44.3	67.0	81.8	10.8	58.7	79.1	43.0	58.7	78.3	35.6	75.4	87.9
П	50.9	42.6	33.1	88.8	89.4	87.0	79.1	64.7	43.0	57.7	54.4	69.8
И-лей Р	33.6	74.0	86.9	26.0	41.8	68.8	20.7	78.0	81.0	50.2	66.6	94.2
П	61.8	59.2	53.3	93.1	96.8	96.1	84.9	78.7	77.0	76.9	91.2	78.4
Лей Р	35.8	73.0	88.5	26.3	43.5	67.4	38.6	75.2	81.6	38.5	79.8	94.5
П	57.4	54.4	38.0	92.3	96.0	97.2	81.4	79.7	78.4	76.5	87.5	72.4
Тир Р	28.9	71.9	87.6	33.5	45.1	68.0	56.9	70.5	86.5	53.1	78.5	94.2

продолжение таблицы 8

1		2			3			4			5		
	П	67.8	48.6	50.1	90.2	94.2	96.4	73.0	73.7	73.7	72.8	88.1	77.5
Фен	Р	32.6	67.2	86.9	20.3	41.4	61.2	35.3	67.1	81.5	42.4	80.5	94.0
	П	53.0	57.8	7.4	92.9	95.5	96.8	83.2	82.6	76.8	74.1	86.6	70.4
Гист	Р	48.5	79.6	91.0	34.5	49.4	73.2	52.6	66.2	84.9	48.1	79.1	94.4
	П	74.9	63.3	8.5	90.6	96.0	95.4	87.1	71.6	62.2	69.6	90.3	70.6
Лиз	Р	17.7	74.4	84.6	18.9	56.3	62.9	29.7	63.3	84.0	43.8	68.7	94.0
	П	49.2	34.4	24.5	92.0	95.3	95.8	64.5	79.8	33.0	80.7	89.3	67.6
Арг	Р	33.6	88.2	95.8	10.7	23.5	62.7	67.3	83.8	94.9	45.0	82.2	94.5
	П	67.5	-	-	90.3	98.1	98.0	85.4	83.0	62.0	88.4	89.1	59.3
НЗА	Р	32.6	76.3	88.7	23.4	41.3	67.4	46.0	71.0	85.0	45.1	80.4	95.0
	П	59.8	56.6	38.2	91.8	96.4	96.5	84.2	76.9	72.9	78.4	88.1	71.7
ЗАМ	Р	47.5	77.9	88.7	23.4	41.6	67.0	56.3	72.1	87.0	51.4	86.7	95.4
	П	59.2	57.3	31.8	92.8	95.8	96.9	81.9	77.0	78.2	73.9	87.9	82.2
СП	Р	46.1	67.6	82.1	14.1	44.6	68.9	57.9	74.7	80.3	49.8	79.1	94.9
	П	44.8	46.6	17.8	92.3	92.9	95.3	78.1	70.7	67.0	77.0	77.8	60.9
СВ	Р	33.6	60.7	82.4	33.7	60.1	76.4	38.0	58.1	67.8	41.2	73.2	89.9
	П	28.8	33.7	14.4	76.0	73.4	70.8	40.4	30.9	22.7	45.1	51.8	31.9

Для всех исследованных кормов, за исключением соевого шрота, в процессе распада и переваривания происходит увеличение аминокислотного индекса (табл. 4). Но это не значит, что незаменимые аминокислоты хуже «перевариваются». Это происходит из-за относительного увеличения в составе протеина недоступной части, имеющей высокое содержание названных аминокислот. Наивысшее значение он достигает в недоступной части протеина. Вместе с тем, процент недоступной фракции невелик и потери с ней незаменимых аминокислот будут незначительными.

Установленные зависимости «переваривания» отдельных аминокислот в кишечнике от степени их распада в преджелудках для удобства можно представить в виде функциональных зависимостей и включить в компьютерную программу, которая позволит быстро проводить нужные вычисления. Метод, уже описанный и апробированный при расчете поступления нераспавшегося протеина корма в кишечник и степени его дальнейшей переваримости (10, 14) нами был применен и для аминокислот:

1) распадаемость кормовых аминокислот

$$P = A + (BC)/(C+K)$$

2) «Переваримость» = f (распадаемости)

3) Всасывание = кормовые аминокислоты + микробные аминокислоты

Исследования позволили определить доступность протеина и аминокислот отдельных кормов для всасывания в кишечнике на рационах с различной распадаемостью протеина. Данные табл. 8 показывают, что целесообразнее всего такие корма как горох, рапс и подсолнечный шрот скармливать в рационах с низкой распадаемостью протеина, тогда доступность протеина и аминокислот из этих кормов в кишечнике будет удовлетворительная. Соевый шрот обеспечивает более 30% аминокислот протеина даже на рационе с высокой распадаемостью.

Данные об аминокислотном составе фракций протеина различных кормов позволяют более точно предсказывать количество аминокислот, поступающих в кишечник и количество их, доступное для обмена в органах и тканях жвачных. В настоящее время полученных данных достаточно для расчета поступления аминокислот из пищеварительного тракта по приведенному выше алгоритму. Используя данные таблицы 1 и значения скорости эвакуации, описанные в работе (12), можно рассчитать распадаемость, а на основе данных, приведенных в нашей работе (10), вычислить переваримость. В то же время для дальнейшего развития системы нами разработан метод анализа переваримости *in vitro* (11), который позволяет расширить банк данных по зависимости переваримости сырого протеина (СП) от его распадаемости в рубце.

Аналогичным образом предлагается вести расчет всасывания отдельных кормовых аминокислот.

Заключение

Результаты исследований позволяют заключить, что при изучении процессов распада протеина корма в рубце достаточно оценивать СП кормов по содержанию растворимой и нерастворимой распадаемой части. Для расчета поступления кормовых аминокислот из преджелудков следует учитывать содержание отдельных аминокислот в протеиновых фракциях и скорость их распада в рубце. При этом создаются возможности проводить расчет усвоения аминокислот из тонкого кишечника на основе зависимости их «переваривания» от степени распада в преджелудках.

Полученные данные об основных количественных аспектах метаболизма белка и аминокислот в желудочно-кишечном тракте жвачных животных позволяют существенно улучшить систему расчетов всасывания аминокислот из пищеварительного тракта коров, что дает возможность целенаправленного регулирования их количественного и качественного состава для удовлетворения потребностей животных в рамках разрабатываемой системы питания молочных коров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аитова М.Д. Метаболизм аминокислот в преджелудках коров. Сб. научн. трудов ВНИИФБиП. Боровск, 1983, 26: 11-22.
2. Аитова М.Д. Аминокислотная питательность кормов для жвачных животных и методы ее определения. Протеиновое питание и продуктивность жвачных животных. Сборн. научн. труд. ВНИИФБиП., Боровск, 1989: 110-118.
3. Ерсков Э.Р. Протеиновое питание жвачных животных. М.: Агропромиздат, 1985: 183.
4. Маркин Ю.В. Физиологическое обоснование методов повышения энергетической и протеиновой обеспеченности лактирующих коров и молодняка крупного рогатого скота. Автореф. дисс... д.б.н., Дубровицы, 1997: 37.
5. Изучение пищеварения у жвачных животных. Методические указания. Боровск, 1987.
6. Курилов Н.В., Севастьянова Н.А. Пищеварение у жвачных. Итоги науки и техники, серия животноводство и ветер., 1978, 25: 5-78.
- 6а. Курилов П.Н. Физиолого-биохимическое обоснование повышения эффективности использования протеина жвачными животными на основе его расщепляемости в рубце. Автореф. дисс... д.б.н., Дубровицы, 1990: 49.
7. Новая система оценки и нормирования протеинового питания коров. Боровск, 1989: 105.

8. Протеиновое питание молочных коров. Рекомендации по нормированию., Боровск, 1998: 28.
9. Пивняк И.Г., Тараканов Б.В. Микробиология пищеварения жвачных. М.: Колос, 1982: 247.
10. Харитонов Е.Л., Материкин А.М., Мыслик Н.Д. Переваривание протеина в кишечнике жвачных животных. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сборн. научн. трудов ВНИИФБиП, Боровск, 1999: 330-343.
11. Харитонов Е.Л., Погосян Д.Г. К методике определения переваримости сырого протеина кормов *in vitro*. Бюлл. ВНИИФБиП, 1992: 1(102).
12. Харитонов Е.Л. Эвакуаторная функция пищеварительного тракта жвачных животных в связи с факторами кормления. С.-х. биология, 1999, 4: 57-63.
13. Харитонов Е.Л. Эвакуация содержимого преджелудков и метаболизм азота в пищеварительном тракте овец в связи с факторами кормления. Автореф. дисс... к.б.н., Боровск, 1989: 21.
14. Харитонов Е.Л., Материкин А.М. Новые подходы к оценке протеина кормов для жвачных. В кн.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве, Боровск, 1995: 123-128.
15. Харитонов Е.Л. Определение распадаемости сырого протеина различными методами. Бюлл. ВНИИФБиП, 1989, 2(94): 58-62.
16. Фицев А.И., Воронкова Ф.В. Растворимость, расщепляемость и аминокислотный состав протеина кормов, используемых в кормлении жвачных. Сельхоз. биол., 1987, 7:8 8-91.
17. The Cornell net carbohydrate and protein system for evaluating cattl diets. Part 1. A model for predicting cattle requirements and feedstuff utilization: Agric. Ithaca, NY: Cornel Univ. Agr. Exp., 1990, 34: 128.
18. Chalupa W., Charles I. et.al. Model generated protein degradation nutritional information. 1990: 44-52.
19. Crooker B.A. Clark J.H. et.al. Effect of ruminal exposure on the amino acid profil of feeds. Can. J. Anim. Sci., 1987, 76: 1143-1148.
20. Hvelplund T., Madsen J. Prediction of individual amino acid passag to the small intestine of dairy cows from characteristics of the feed . Acta Agric. Scand., 1989, 39: 65-78.
21. Hobson P.N. Physiological characteristic of rumen microbes and relation to diet and fermentation patterns. Symp.on manipulation of rumen fermentation. Proc. Nutr. Soc., 1972, 31, 1: 135-139.
22. Voigt J., Piatkowsky B., Engelmann M., et.al. Measurement of the postruminal digestibility of crude protein by the bag technique in cows. Arch. fur Tierernahr., 1985, 35, 8: 555-562.
23. Van Soest P.J., Sniffen C.J., Mertens D.R. et.al. A net protein system for cattle: The rumen submodel for nitrogen. In ; Protein requirements for cattle. Symp.-MP-109. Oklahoma, 1982: 265-279.

ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ КОРМА У КОРОВ В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ЛАКТАЦИИ

*В.И. Агафонов, В.Б. Решетов, В.П. Волобуев,
В.П. Лазаренко, Е.А. Надальяк*
Лаборатория энергетического питания

В статье приведены экспериментальные данные, отражающие особенности использования энергии и субстратов, доступных для усвоения или эндогенного происхождения, у коров в период от отела до 4-х месяцев лактации. Установлено, что в период мобилизации энергетических резервов организма высшие жирные кислоты интенсивно используются в энергетическом обмене, составляя до 60 % тканевой теплопродукции, при существенном снижении использования ацетата (до 16,5%). Таким образом, создаются предпосылки преимущественного использования ацетата на синтез жира молока. В последующий период, к 3,5-4 мес лактации, использование ацетата в энергетическом обмене возрастало до 41% от величины суточной теплопродукции животных. Установленные закономерности будут учтены при обосновании способов определения потребности в субстратах у лактирующих коров в начальный период лактации и в период 3-4 месяцев, когда происходит использование ЛЖК, образующихся из питательных веществ корма. Эти данные необходимы для совершенствования нормированного кормления молочных коров.

Введение

Разработка системы питания жвачных, основанной на оценке субстратной обеспеченности метаболизма, означает новый этап в развитии теории и практики кормления животных. Концепция системы не ограничивается представлениями об энергетических принципах, заложенных в существующих системах нормированного кормления (NRC, NEF, JNRA, ARC, ОЭ). Условность энергетических принципов оценки питательности кормов и нормированного кормления животных в этих системах не вызывает сомнений. Можно убедиться, что у продуктивных животных некоторая часть усвоенных субстратов не используется в энергетическом обмене, а в качестве исходных молекул (аминокислоты, ЛЖК, ВЖК, глюкоза) участвуют в синтезе белков жира и углеводов, которые или откладываются в организме, или выделяются, например, с молоком. Исходя из этих предпосылок в перспективе целесообразно определять количественные потоки и основные пути обмена каждого субстрата, поступившего в кровь и его конечное использование в биосинтезе или в энергетическом обмене. Такие измерения и

предусматривает концепция субстратной обеспеченности метаболизма у животных (1-4).

В институте к разработке системы нормированного питания молочных коров приступили в начале 90-х годов (1-5). Разработаны методы количественного определения субстратов, образующихся в желудочно-кишечном тракте и доступных для усвоения (3). Разработан способ количественного определения субстратов, используемых в энергетическом обмене, на основе анализа суточной теплопродукции (6). Это позволяет прогнозировать количественное образование первичного фонда субстратов в желудочно-кишечном тракте и разделять их на две группы: используемые в энергетическом обмене и включаемые в компоненты продукции.

Целью исследований на данном этапе являлось количественное определение энергозатрат у лактирующих коров в период раздоя, анализ баланса энергии и теплопродукции с последующим расчетом субстратов, обеспечивающих энергетический обмен у коров в первые четыре месяца лактации. Были поставлены следующие задачи:

изучить балансы энергии у лактирующих коров в период до 4-х месяцев лактации;

изучить особенности энергетического обмена у лактирующих коров в начальный период лактации;

провести расчеты по количественному образованию субстратов в желудочно-кишечном тракте у лактирующих коров;

провести расчеты по количественному использованию субстратов в энергетическом обмене.

Материал и методы

Исследования проведены на лактирующих коровах в виварии института в двух опытах.

Первый опыт проведен на 4-х лактирующих коровах в первые 40 дней лактации. Содержание коров привязное; кормление индивидуальное, с ежедневным учетом потребления корма. Для новотельных коров использовали сено-силосно-корнеплодно-концентратные рационы (табл. 1). В первые два дня после отела коровам скармливали сено (до 8 кг) и комбикорм (до 2кг в день). В дальнейшем в рационы вводили кормовую свеклу и силос. Эффективность раздоя контролировали путем ежедневного учета молочной продуктивности. Периодически через 7-10 дней проводили респирационные исследования. Калорийность молока определяли на 5, 20 и 35-й дни после отела. Живую массу коров определяли взвешиванием, два раза в месяц. В 33-35-дневный период провели двухсуточный обменный опыт для определения уровня отрицательного баланса энергии в организме коров и для расчета

образования субстратов в желудочно-кишечном тракте и использования их в энергетическом обмене.

Таблица 1. Рационы для лактирующих коров (по фактической поедаемости кормов. I опыт

Показатели	15-й день лактации	35-й день лактации
Сено зл.многол.трав, кг	4,5	4,3
Силос вико-овсяный, кг	24	23,7
Свекла кормовая, кг	7,1	12,0
Комбикорм, кг	6,6	7,5
Итого, кг	42,2	47,5
В рационах содержится:		
Кормовые единицы	11,1	12,2
Обменная анергия, МДж	134,0	146,0
Сухое вещество, кг	15,6	17,4
Органическое вещество, кг	14,3	16,0
Сырой протеин, г	2010	2200
Целлюлоза, г	3015	3156
Гемицеллюлоза, г	2640	2838
Лигнин, г	1050	1115
Крахмал, г	2790	3196
Сахар, г	790	1037
Сырой жир, г	395	422
Фонд субстратов в желудочно-кишечном тракте		
Ацетат, г	3550	3800
Пропионат, г	1060	1156
Бутират и др., г	600	642
Сумма аминокислот, г	1225	1330
Сумма высших жирных к-т, г	290	305
Глюкоза, г	633	906

В период раздоя коров использовали комбикорма различного состава. В первые 15 дней после отела в состав комбикорма были включены ячменная дерть, овсяная дерть и подсолнечниковый шрот. Комбикорм характеризовался высокой доступностью углеводов и протеина для микроорганизмов в преджелудках, что способствовало развитию преджелудочного пищеварения.

В последующий период для новотельных коров использовали комбикорм с соевым шротом – 20 % по массе и кукурузной дертью – 30 %, обеспечивающий снижение доступности углеводов и протеина корма для микроорганизмов в преджелудках. Этим достигалось снижение образования ацетата и увеличение образования пропионата. Крахмал

кукурузы частично попадал в тонкий кишечник, где переваривался до глюкозы. При этом повышалось продуктивное действие корма.

Второй опыт проведен на 8 коровах. Были сформированы две группы по 4 головы по принципу аналогов: по живой массе, срокам отела, уровню молочной продуктивности. После предварительного периода (20 дней) коровы были переведены на рационы, рассчитанные по двум вариантам: для коров контрольной группы – по детализированным нормам кормления, а для коров опытной группы – по новому варианту, разрабатываемому во ВНИИФБиП (с учетом качества протеина и углеводов корма; количества и соотношения субстратов, образующихся в желудочно-кишечном тракте и доступных для усвоения)(табл. 2 и 3).

Таблица 2. Рацион кормления коров контрольной группы, составленный по детализированным нормам (М., 1995)(9)

(живая масса коров – 450 кг; удой – 18 кг; жира – 3,7%)

Показатели	Сено злаковых мн. трав	Силос вико-овс.	Дерть ячменя с овсом + мин. доб. и премикс	Жмых подсолнечный	Свекла кормовая	Итого	Требуется по нормам
1	3	4	5	6	7	8	9
Количество корма, кг	3,3	21	4,5	2	12	42,8	–
Корм. ед.	1,45	4,35	4,50	1,80	1,45	13,55	13,25
Обм. энергия, ЭКЕ	2,10	5,30	4,45	2,00	1,55	15,40	15,40
Сухое вещество, кг	2,80	6,00	3,85	1,80	1,30	15,75	15,70
Конц. ЭКЕ в 1 кг СВ	0,75	0,85	1,16	1,11	1,19	0,98	0,98
Сыр. протеин, г	260	625	450	640	105	2080	2080
Перев. протеин, г	145	340	335	500	80	1400	1390
Лизин, г	9	38	20	38	5	110	110
Метионин, г	3	18	15	20	2	58	56
Триптофан, г	3	8	8	20	2	40	40
Сырая клетчатка, г	990	2100	350	350	120	3910	3940
Крахмал, г	30	75	1890	50	–	2045	2020
Сахар, г	120	200	180	110	720	1330	1330
Сырой жир, г	65	175	120	140	10	510	450
Поваренная соль, г	–	–	94	–	–	94	94
Кальций, г	9	35	40	7	4	95	94
Фосфор, г	4	16	25	18	5	68	68
Магний, г	3	12	5	5	2	27	25
Калий, г	42	80	25	15	40	202	100
Сера, г	3	10	10	6	2	31	32
Железо, мг	330	1500	225	600	80	2735	1070
Медь, мг	20	45	22	48	19	154	121
Цинк, мг	63	155	490	80	32	820	820
Марганец, мг	155	185	275	95	110	820	820

продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
Кобальт, мг	1,8	3,2	2,6	0,8	1,0	9,4	9,4
Йод, мг	0,9	1,5	6,7	1,3	1,0	11,4	11,4
Каротин, мг	40	560	–	–	–	600	600
Витамин Д, тыс МЕ	1,2	1,5	11,7	–	–	14,4	14,4
Витамин Е, мг	210	650	100	–	7	967	535
Перевар.протеин на 1 ЭКЕ	–	–	–	–	–	89	88
Сахар/протеин. отношение	–	–	–	–	–	0,95	0,95

Таблица 3. Рационы для лактирующих коров (по фактической по-
даваемости кормов). II опыт

Показатели	I период 2,5-3 мес лактации		II период 3,5-4 мес лактации	
	контроль- ная группа	опытная группа	контроль- ная группа	опытная группа
Сено зл.-боб. мн. трав, кг	1,62	1,98	1,29	2,69
Силос вико-овсяный, кг	17,02	15,71	17,00	14,72
Свекла кормовая, кг	14,00	13,50	12,00	6,00
Комбикорм 1, кг	–	7,00	–	7,80
Комбикорм 2, кг	6,00	–	6,60	–
Итого, кг	38,64	38,19	36,89	31,21
	В рационах содержится:			
Корм. ед.	13,04	14,00	13,55	14,23
Обменная энергия, МДж	13,63	14,77	13,54	14,58
Сухое вещество, кг	14,20	14,76	14,62	15,00
Орг. вещество, кг	12,89	13,48	13,28	13,76
Сырой протеин, г	1798	2030	1993	2116
Целлюлоза, г	2426	2403	2524	2579
Гемицеллюлоза, г	2350	2251	2430	2623
Лигнин, г	989	955	1023	1009
Крахмал, г	1945	2493	1978	2552
Сахар, г	1430	1246	1203	887
Сырой жир, г	779	678	837	716
	Фонд субстратов в желудочно-кишечном тракте			
Ацетат, г	3100	3090	2995	2958
Пропионат, г	1140	1289	1003	1235
Бутират и др., г	881	906	775	868
Сумма аминокислот, г	1090	1250	1140	1250
Сумма высших жирных кислот, г	520	460	560	480
Глюкоза, г	190	540	160	660

Проведено две серии исследований методом групп-периодов. Во второй серии опытов рационы в группах коров были взаимно заменены (коровы контрольной группы стали получать рацион коров опытной группы и наоборот) с корректировкой на уровень продуктивности.

Продолжительность периода – 30 дней. В конце каждого периода проведены балансовые и респирационные исследования (8).

Результаты и обсуждение

Первый опыт. Схема кормления новотельных коров предусматривала два этапа. На первом этапе ставилась задача восстановления функций потребления корма у новотельных коров путем постепенного увеличения объема рациона и возможной оптимизации преджелудочного пищеварения. Так как в этот период ежедневно увеличивали количество комбикорма, то было предусмотрено, что протеин и углеводы его должны быть максимально доступными для микроорганизмов в преджелудках (комбикорм 1)(табл. 4).

Таблица 4. Состав комбикормов, % по массе

Компоненты	I опыт		II опыт	
	комб. 1	комб. 2	комб. 1	комб. 2
Кукуруза	–	30	30	5
Ячмень	51	36	–	–
Овес	20	–	–	–
Зерносмесь (ячмень+пшеница)	–	–	38	56
Шрот подсолнечный	25	10	–	–
Жмых подсолнечный	–	–	5	30
Шрот соевый	–	20	23	5
Трикальцийфосфат	1,5	1,5	1,5	1,5
Соль поваренная	1,5	1,5	1,5	1,5
Премикс ПКК60-1	1,0	1,0	1,0	1,0

За данный период потребление корма у коров возросло по сравнению с рационом в сухостойный период на 60 % (по сухому веществу). Молочная продуктивность к 15-дневному периоду возросла до $23,6 \pm 2,2$ кг на корову в сутки (табл. 5).

Таблица 5. Молочная продуктивность коров, кг

Дни лактации	Номера коров				В среднем M±m
	3	5	6	7	
10	23,2	21,5	23,7	22,2	22,6±0,5
15	24,1	20,3	25,8	24,3	23,6±2,2
20	24,8	22,6	25,8	23,3	24,1±0,7
25	26,0	22,6	26,2	24,7	24,9±0,8
30	27,2	22,8	27,0	24,0	25,3±1,1
35	26,3	23,9	26,0	24,6	25,2±0,6
40	26,1	25,0	26,0	23,4	25,1±0,6

На втором этапе раздоя молочная продуктивность коров достигала уровня 27 кг/сутки, что можно отнести к продуктивному действию комбикорма нового состава с пониженной расщепляемостью протеина

и низкой доступностью углеводов для микроорганизмов в преджелудках (комбикорм 2). В течение 40 дней лактации потребление корма было недостаточным для обеспечения фактического уровня молочной продуктивности. В первые дни лактации дефицит обменной энергии в фактически потребленном корме был максимальным – 24,5 МДж/сутки, а к 40 дню – незначительным – 4,0 МДж/сутки (табл. 6).

Таблица 6. Содержание обменной энергии в рационах и фактический уровень обменной энергии у новотельных коров

Дни лактации	Обменная энергия рациона, МДж	Обменная энергия у коров, МДж	Дефицит энергии в рационе, МДж
5	101	125,50	(-24,50)
10	125	145,25	(-20,25)
15	134	152,25	(-18,25)
20	139	156,00	(-17,00)
25	143	158,75	(-15,75)
30	146	155,75	(-9,75)
35	146	154,75	(-8,75)
40	149	153,00	(-4,00)

Величина отрицательного баланса энергии у коров в начале лактации зависит от метаболического типа молочного скота, от упитанности и других факторов. Установлено, что высокий уровень мобилизации жировых депо в начале лактации приводит к повышению молочной продуктивности и, одновременно, к нарушению обмена веществ: кетозам, ацидозам (10). Оптимизация рационов для новотельных коров может привести к уменьшению мобилизации жира и снижению отрицательного влияния на обмен веществ.

Известно, что летучие жирные кислоты у жвачных обеспечивают до 50 % и более энергетических затрат в организме (7). В наших исследованиях у коров в начале лактации установлены существенные изменения в энергетическом обмене. В этот период лактации отмечалось очень низкое включение ацетата в энергетические процессы – около 16,5 % от общей теплопродукции у коров на 15-й день лактации (табл. 7).

Таблица 7. Использование субстратов в энергетическом обмене у коров

Показатели	15-й день лактации	35-й день лактации
Суточная теплопродукция у коров, МДж	75,6±2,1	84,8±2,7
Величина дыхательного коэффициента	0,785±0,005	0,794±0,008
Количество субстратов, используемых в энергетическом обмене		
Белок и др. азотосодержащие в-ва, г	420±16	470±8
Ацетат и глюкоза, г	1278±108	1599±155
Высшие жирные к-ты, кетоны, г	1226±21	1314±45

Вклад высших жирных кислот и кетонов в энергетический обмен был очень высоким и достигал 65% от общей теплопродукции у коров на 15-й день лактации и 57 % – на 35-й день лактации. Для расчета субстратов, используемых в энергетическом обмене, применяли известную методику, усовершенствованную Демченко П.В. (6).

Общие закономерности энергетического обмена у коров в начальный период лактации отражают высокую эффективность энергозатрат на биосинтез. Если использование обменной энергии на биосинтез молока равно 60%, то эффективность использования мобилизованных эндогенных источников достигает 82 % (ARC, NRC)(11, 12). Основным механизмом повышения эффективности синтеза компонентов молока у новотельных коров является переход на эндогенные источники энергии.

Исходя из полученных данных можно предположить, что у новотельных коров потребность в ацетате высокая и она не обеспечивается за счет корма. В этих условиях поступающий в кровь ацетат приоритетно используется на синтез жира молока. Практических подходов к решению вопросов оптимизации рационов для новотельных коров в настоящее время не найдено. Имеющиеся рекомендации по раздоя новотельных коров исходят из предпосылок повышения общего уровня кормления, что повышает удой при одновременном снижении качества и калорийности молока. Исходя из этого и возникает необходимость в разработках по оптимизации рационов новотельных коров и их оценки по количеству и соотношению субстратов, образующихся в желудочно-кишечном тракте и доступных для усвоения.

Во втором опыте на лактирующих коровах при одинаковой расчетной питательности рационов в контрольной и опытной группах содержание обменной энергии в фактически потребленных кормах рационов достоверно различалось в первой серии исследований – на 11,4 МДж, во второй серии – на 10,4 МДж ($P < 0,05$). Поедаемость комбикорма и свеклы у коров обеих групп была полная. Поедаемость сена и силоса у коров контрольной группы составляла 54 и 81%. Поэтому фактическая питательность рациона была ниже планируемой, а молочная продуктивность, в пересчете на 4 % молоко, не достигла планового уровня (15,2 кг/сутки). У коров опытной группы молочная продуктивность соответствовала заданным параметрам (в пересчете на 4 % молоко 17,8 кг/сутки).

Неполная поедаемость кормов у коров контрольной группы явилась следствием недостаточно обоснованного нормирования по ряду показателей. Например, при планировании удоя 18 кг рекомендован высокий уровень сырой клетчатки (до 4 кг на корову в день) при концентрации ее в сухом веществе рациона – 25 %. Фактическое потребление сырой клетчатки коровами контрольной группы составляло 2720г

в сутки, а концентрация сырой клетчатки – 18,4% от сухого вещества рациона. Следовательно рацион, составленный по детализированным нормам, не является оптимальным, а норма сырой клетчатки является завышенной на 30%, что приводит к неполной поедаемости сена и силоса. Коровы опытной группы поедали сено на 66,5% а силос – на 98%, что указывает на более высокую сбалансированность рациона у коров опытной группы, по сравнению с контролем. Фактическое потребление сырой клетчатки у коров опытной группы было более высокое, и этот эффект получен за счет оптимизации рационов, включающей учет качества протеина и углеводов корма и соотношения основных кормов в рационе.

Баланс энергии и использование субстратов в энергетическом обмене на рационах, разработанных на основе детализированных норм (контроль) и по новому варианту нормированного кормления (опыт) коров (ВНИИФБиП), представлены в таблице 8. Получены достоверные различия по величине обменной энергии и энергии удоя между контролем и опытом у коров в период 2,5-3 месяцев лактации.

Таблица 8. Балансы энергии (МДж) и использование субстратов (г) в энергетическом обмене

Показатели	Первая серия 2,5-3 месяца		Вторая серия 3,5-4 месяца	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Валовая энергия корма	267,2±12,4	279,1±4,0	266,4±6,9	276,6±13,2
Содержание энергии в кале	97,2±10,1	96,6±2,1	97,4±2,7	95,3±9,5
Энергия переваримых питат. веществ	170,0±3,7	182,5±3,3	169,0±7,0	181,3±7,6
Энергия метана и теплота ферментации	29,3±0,7	30,9±0,7	28,9±1,2	30,9±0,9
Содержание энергии в моче	4,4±0,2	3,9±0,1	4,8±0,2	4,7±0,2
Обменная энергия	136,3±2,8*	147,7±2,9*	135,4±5,2	145,8±6,5
Энергия удоя	45,4±1,7*	53,6±2,1*	53,0±4,2	55,7±4,4
Теплопродукция	83,1±5,0	85,2±4,0	79,5±2,9	74,4±15,7
Отложено энергии в теле	7,8±3,4	9,0±2,7	2,9±3,8	15,7±9,1
Анализ теплопродукции				
Дыхательный коэффициент	0,803	0,800	0,872	0,861
Использование субстратов в энергетическом обмене				
Азотосодержащие вещества	460	500	500	530
Глюкоза, молочная кислота	515	527	495	460
Ацетат	1365	1338	2234	1877
Высшие жирные кислоты и кетоновые тела	1370	1430	745	750

Примечание: * – различия достоверны при $P < 0,05$

Во второй серии исследований (3-4-й месяцы лактации), когда рацион у коров контрольной группы был использован в опытной груп-

пе, удалось сохранить величину энергии суточного удоя, хотя при этом существенно сократилось количество энергии, отложенной в тканях (с 9,0 до 2,9 МДж/сутки). При скармливании коровам контрольной группы рациона коров опытной группы возросла величина обменной энергии и энергии суточного удоя. При анализе теплопродукции у коров в период 2,5-3 мес лактации и 3,5-4 месяцев лактации установлено увеличение дыхательного коэффициента по сравнению с начальным периодом лактации (табл. 8). Даже в период 2,5-3 месяцев лактации этот коэффициент был очень низким и, следовательно, участие ацетата в энергетическом обмене возросло незначительно – до 24% от величины общей теплопродукции в контроле и до 23 % в опыте. Только в период 3,5-4 месяцев лактации вклад ацетата в общую теплопродукцию возрос до 41% у коров опытной группы и до 37 % – у коров контрольной группы. Таким образом, установлен послеотельный период у коров (от отела до 2,5-3 месяцев), когда использование ацетата в энергетическом обмене существенно ограничено, что не соответствует сложившимся представлениям об энергетическом обмене у жвачных (13).

Заключение

Установлены количественные параметры использования ацетата, высших жирных кислот, азотсодержащих субстратов и глюкозы у коров в начале лактации и до 4-месячного периода. Особенностью энергетического обмена у коров в начале лактации (до 35 дней) является низкое использование ацетата в качестве субстрата окисления – 16,5-18,5% от суточной теплопродукции животных. В дальнейшем, в период 2,5-3 месяцев лактации, включение ацетата в энергетический обмен возросло до 23,0-24,1 %, а к 3,5-4 месяцам лактации – до 37,0-41,2 %.

В этих условиях основными источниками энергии становились высшие жирные кислоты, фонд которых формируется из высших жирных кислот, поступающих из желудочно-кишечного тракта и за счет мобилизации из жировых депо. Их общее количество обеспечивает до 60 % теплопродукции животного, до 40-50 % синтеза жира молока (10). Вероятно этими условиями определяется количество мобилизованных высших жирных кислот у новотельных коров.

Что касается использования азотсодержащих субстратов и глюкозы в энергетическом обмене у новотельных коров, то они достаточно стабильны, так как необходимы для ряда конкретных функций (поддержания функций обновления структурных элементов тканей, энергетических процессов в центральной нервной системе, использования в пентозо-фосфатном цикле для генерации НАДФН₂ и др.)(13, 14).

В проведенных исследованиях предпринята попытка регулирования кормления лактирующих коров в первые 15 дней лактации и в

последующий период за счет кормовых средств, главным образом путем последовательного изменения состава комбикормов в период раздоя, с целью создания различных вариантов доступности протеина корма и углеводов для микроорганизмов в преджелудках (новые разработки ВНИИФБиП).

У новотельных коров потребность в субстратах существенно отличается от фонда субстратов, образующихся в желудочно-кишечном тракте. Например, поступление высших жирных кислот с кормом и за счет дополнительного синтеза липидов микроорганизмов у коров в I опыте составляло 305 г, а общая потребность в ВЖК составляла 2000-2200 г. Поэтому расчет потребности в субстратах необходимо проводить с учетом физиологического состояния коров, которое отражается на количестве и качестве продукции и на эффективности использования субстратов на продукцию. Лактация у новотельных коров является наиболее сложным периодом перестройки обменных процессов с использованием определенного количества эндогенных субстратов на биосинтез компонентов молока и в энергетическом обмене.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агафонов В.И., Надальяк Е.А. Основные достижения в разработке принципов энергетического питания сельскохозяйственных животных. В сб.: Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. Боровск, 1991:12-24.
2. Агафонов В.И., Решетов В.Б. Структура фонда субстратов в желудочно-кишечном тракте у лактирующих коров. В сб.: Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания сельскохозяйственных животных. Отчет ВНИИФБиП за 1990-1991 годы. Боровск, 1991: 103-104.
3. Агафонов В.И., Волобуев В.П. Методика расчета количества субстратов, образующихся в желудочно-кишечном тракте у коров. В сб.: Проблемы физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных. Боровск, 1993:147-148.
4. Агафонов В.И. Нормирование энергии у жвачных животных по принципу субстратной обеспеченности метаболизма. В сб.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Материалы II Межд. конф. Боровск, 1995: 97-105.
5. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П., Волобуева Р.А., Лазаренко В.П., Морозова А.Ю., Надальяк Е.А. Обеспеченность субстратами энергетических процессов у коров при различных уровнях кормления и продуктивности. Сб. тр. ВНИИФБиП, Боровск, 1999, 39: 375-384.
6. Демченко П.В. Биологические закономерности повышения продуктивности животных. М., 1972: 295.
7. Курилов Н.В. Физиология и биохимия пищеварения жвачных. М., Колос, 1971: 430.
8. Изучение обмена энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Методические указания. Боровск, 1986: 56.

9. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие, ч.1. М., 1995: 400 с.
10. Овчаренко Э.В. Физиологические основы питания и молокообразования у коров в ранний период лактации в связи с уровнем и качеством энергии и протеина в рационе. Автореф. дисс...д.б.н., Боровск, 1990: 50.
11. ARC. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Reference Wook. 433.
12. NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle Sixth Revised Edition. Washington, 1988.
13. Piatkowski B. Grundzuge der Wiederkauer Ernährung. Jens, 1990: 236.
14. Riis P.M., Danfaer A., Hvelpland T. et al. A model for the efficient use of new information within physiology, nutrition and breeding of dairy cow Tryk. Fredeiksberg Bogtrykneri a.s. 1990: 68.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫВЕДЕНИЯ ЭНЕРГИИ С ОРГАНИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ МОЧИ У КОРОВ

В.Б. Решетов

Лаборатория энергетического питания

В работе описаны количественные параметры и общие закономерности выведения энергии с мочой в связи с условиями питания и физиологическим состоянием коров. Проанализирована зависимость содержания энергии в органических веществах мочи от их элементарного состава, происхождения и роли в обмене веществ.

Введение

Под энергией мочи в исследованиях по энергетическому обмену и питанию подразумевают валовую энергию, содержащуюся в органических веществах выделенной мочи, обычно в расчете за сутки. Несмотря на огромное количество публикаций, в которых фигурирует показатель «энергия мочи», материалов по прямому определению его величины (путем полного сбора мочи и определения содержания в ней энергии прямой калориметрией) сравнительно немного. Кроме того, многие авторы умалчивают о том, что приводимые числовые значения по содержанию энергии в моче получены расчетными методами, в результате чего иногда публикуются несоответствующие действительности материалы. Хорошо, если при этом верно выявлены имевшие место тенденции (3). При пользовании же константами даже очень опытные и авторитетные исследователи могут исказить физиологические закономерности (7). Поскольку количественные параметры и общие физиологические закономерности выведения энергии с мочой у крупного рога-

того скота, по указанным выше причинам, описаны очень слабо, часть данной работы посвящена выявлению факторов, определяющих количество выделяемой коровами мочи и ее состав.

Основную массу органических веществ мочи составляют азотсодержащие соединения. У крупного рогатого скота до 80% азота мочи содержится в мочеvine (1, 8). Кроме того, с мочой выделяются мочева кислота, ксантин, аллантаин, креатинин, гиппуровая и фенацетуровая кислоты. В норме в моче содержатся также в небольшом количестве соли аммония и гликопротеиды и, в очень небольшом – белки крови и свободные аминокислоты. Происхождение отдельных веществ в настоящее время представляется следующим. Мочевина синтезируется в печени из аммиака, поступающего из тканей организма и содержащегося в пищеварительного тракта. Мочевая кислота – конечный продукт обмена пуриновых оснований. Ксантин – предшественник мочева кислоты. Аллантаин – продукт обмена пуринов преимущественно микробного происхождения (16-18, 20). Креатинин образуется в мышцах из креатина. Гиппуровая и фенацетуровая кислоты считаются продуктами нейтрализации токсичных бензойной и фенилуксусной кислот.

Второй аспект работы – доказательство предположения, что на основании данных о калорийности мочи и содержании в ней азота (N) и углерода (C) можно получить значимую косвенную информацию об интенсивности синтеза микробного протеина в преджелудках, долевом соотношении переваривания протеина корма в преджелудках и кишечнике и, по-видимому, об интенсивности процессов детоксикации в организме. Причем эта информация оказывается дополнительной, не требующей проведения специальных биохимических исследований при постановке обменных опытов.

В определенный период времени в прикладной биохимии довольно широко использовали показатель «вакат-кислород мочи», под которым подразумевали количество кислорода, необходимое для полного окисления всех веществ, выводимых с суточным количеством мочи (4). У человека, при появлении в моче несвойственных «норме» веществ (кетонных тел, глюкозы, некоторых органических кислот) величина этого показателя могла даже удваиваться. Автором показано, что у жвачных, в данном случае коров, большой сдвиг калорийности мочи в расчете на единицу азота имеет место в условиях физиологической нормы при переходе от низкой продуктивности к более высокой, вследствие двойного генеза части азотистых веществ мочи – или из тканей организма, или из веществ, генерируемых в содержимом пищеварительного тракта, и изменения их соотношения при изменении уровня кормления.

Материалы и методы

Представленные материалы получены при анализе результатов обменных опытов ($n = 80$), проведенных автором статьи (17), и материалов, содержащихся в книге Н.И. Денисова (5). В опытах использовали коров холмогорской и черно-пестрой пород с живой массой 480-600 кг. Кормили коров в соответствии с действовавшими в период проведения опытов нормами (12, 13). Грубыми кормами обеспечивали в некотором избытке, чтобы полностью реализовать потенциал потребления сухого вещества. Балансовые опыты продолжались не менее 5 дней, в течение которых проводили учет потребления кормов и полный сбор кала и мочи.

Мочу консервировали путем закисления соляной кислотой. Калорийность кормов, молока, кала и мочи определяли после высушивания с помощью адиабатического калориметра. Содержание азота в моче – по Кьельдалю. Содержание углерода – путем анализа газов, образующихся при сжигании пробы.

Использованную в расчетах величину «видимо переваренной» энергии определяли как разницу между валовой энергией корма и валовой энергией кала.

Результаты и обсуждение

Первым моментом, выявленным путем корреляционного анализа, была различная зависимость суточного количества мочи от количества азота в ней и от общего количества влаги в рационе (табл. 1).

Таблица 1. Зависимость суточного количества мочи от количества в ней азота и общего количества влаги в рационе

Доминирующий корм рациона	Анализируемая связь	
	объем мочи – количество азота	объем мочи – количество влаги
Сено	$r = 0,84 (P < 0,01)$	$r = 0,25$
Силос	$r = 0,65 (P < 0,01)$	$r = 0,17$
Трава	$r = 0,48 (P < 0,01)$	$r = 0,69 (P < 0,01)$

На рационах с большим количеством сена, т.е. содержащих мало влаги, отмечена высокодостоверная положительная корреляция между суточным количеством мочи и количеством азота, а между объемом мочи и количеством влаги в рационе связь значительно слабее и недостоверна. На рационах со значительным количеством силоса также установлена достоверная положительная связь между объемом мочи и

количеством азота в ней, при положительной, но недостоверной связи с количеством влаги в кормах. На летних рационах, с большим количеством травы, доминирующей оказывалась положительная связь между количеством мочи и количеством влаги в рационе, при некотором ослаблении связи между объемом мочи и количеством азота в ней. Иными словами, у животных, получающих рационы с высоким содержанием влаги, объем мочи в большей степени определяется содержанием влаги в корме, которую необходимо вывести из организма, нежели количеством азотсодержащих веществ.

Материалы по количеству мочи, выделяемому коровами за сутки при различном физиологическом состоянии и разных условиях кормления, по калорийности мочи, валовой энергии суточного количества мочи и величине ее доли в энергии переваренных веществ содержатся в таблице 2. По калорийности мочи достоверными были различия между следующими парами показателей: 1) между мочой лактирующих коров на зимних рационах и рационах со свежескошенной травой ($P<0,01$); 2) между мочой лактирующих коров на зимних рационах и мочой сухостойных коров ($P<0,01$). По величине доли энергии мочи от «видимо переваренной» энергии разница была достоверной между лактирующими коровами и сухостойными глубокостельными ($P<0,01$).

Таблица 2. Энергия мочи и ее доля в «видимо переваренной» энергии у лактирующих и глубокостельных сухостойных коров при разных уровнях потребления «видимо переваренной» энергии

n	Переваренная энергия, МДж/сут	Энергия удоя, МДж/сут	Объем мочи, л/сут	Калорийность мочи, кДж/л	Энергия мочи, МДж/сут	Доля энергии мочи от переваренной энергии, %
Лактирующие коровы на зимних рационах						
18	126-163	52,3±2,5	11,2±0,7	657±34	7,1±0,4	4,74±0,29
27	172-209	61,9±2,5	13,8±0,9	686±38	8,8±0,4	4,58±0,19
14	213-251	71,1±5,4	15,4±1,3	661±34	9,6±0,4	4,39±0,19
3	260-268	72,4±2,9	13,7±1,2	657±75	8,8±0,4	3,40±0,15
В среднем по всем 62 случаям:				670±21		4,51±0,13
Лактирующие коровы на рационах со свежескошенной травой						
при энергии суточного удоя 29-42 МДж/сут						
5		35,1±2,1	14,0±1,6	502±46	7,1±0,8	
при энергии суточного удоя 46-67 МДж/сут						
6		57,7±3,8	18,2±1,8	418±21	7,5±0,8	
В среднем по 11 случаям:				456±25		
Сухостойные глубокостельные коровы на зимних рационах						
9	84-105	–	10,0±0,6	916±42	9,2±0,4	9,4±0,5
9	109-126	–	11,3±0,9	744±38	8,4±0,4	7,2±0,5
В среднем по всем 18 случаям:				833±34	8,8±0,4	8,3±0,41

Очевидно, что выведение энергии с мочой в норме не имеет существенного значения для сохранения энергетического равновесия организма коровы. По нашим данным, энергия мочи, выделяемой за сутки лактирующими коровами, равняется в среднем $4,5 \pm 0,1\%$ от переваренной энергии, имея размах от 1,9 до 7,3 %, причем особенно большой размах отмечен у низкопродуктивных коров. По мере роста продуктивности вариабельность этого показателя резко снижается. У глубокостельных сухостойных коров доля энергии мочи от переваренной энергии намного больше – порядка $8,3 \pm 0,41\%$, причем с ростом уровня кормления она уменьшается. Довольно устойчивую цифру для доли энергии мочи, порядка 2% от валовой энергии потребленного лактирующими коровами корма, что соответствует примерно 2,9% от перевариваемой энергии (рассчитанной, по-видимому, для уровня поддержания) показали и зарубежные исследования последних лет (21). В связи с малой вариабельностью доли мочи от «переваренной» энергии, при расчете обменной энергии у жвачных сочтено возможным включать энергию мочи в общую сумму вместе с энергией метана и теплотой ферментации в желудочно-кишечном тракте (15).

В литературе описаны определенные закономерности экскреции азотистых веществ с мочой (8, 11, 23). Количество протеина в рационе положительно коррелирует с концентрацией мочевины в крови и выделением азота с мочой за сутки. Отмечена прямая корреляция между уровнем мочевины в плазме и концентрацией мочевины в моче. По данным Street et al. (цитир. по Ноздрину Н.Т. и др. (11)) взаимосвязь между содержанием азота и энергии в моче телят и овец описывается уравнением регрессии $Y = 0,026 + 0,117X$, где Y – количество энергии в моче (ккал/г), а X – количество азота в моче (%). По-видимому, с этим можно согласиться, поскольку основная масса (до 80%) азота мочи представлена азотом мочевины.

Далее остановимся на характеристиках калорийности и химического состава мочи. В опытах с варьированием условий питания коров для оценки изменений в физиологическом состоянии животного (в частности, интенсивности процессов микробного переваривания питательных веществ в преджелудках) достаточно информативным оказался показатель «количество энергии в моче в расчете на 1 г экскретируемого с ней азота». Вторым заслуживающим внимания показателем является отношение по массе количества углерода и азота (C/N). Измерение отношения именно по массе, а не по количеству атомов, обусловлено привязкой этого показателя к измеряемым в обменных опытах по массе количествам азота и углерода.

Для того, чтобы иметь возможность понять механизм изменений калорийности мочи в расчете на 1 г азота и величины C/N, в таблице 3 приведены энергетическая и химическая характеристики основных

азотсодержащих веществ мочи. Следует обратить внимание на следующие особенности рассматриваемых веществ. Минимальное количество энергии в расчете на 1 г азота содержит мочеви́на – 23,8 кДж/г. Несколько больше – аллантаин (32,9) и мочева́я кислота (37,3 кДж/г). К этому же уровню близок показатель и у белка – 35,6 кДж/г. Существенно выше он у ксанти́на (43,3 кДж/г) и креати́нина (56,6 кДж/г). Во много раз больше этот показатель у гиппу́ровой (320 кДж/г) и фенацету́ровой кислот (370 кДж/г). Общим выводом из анализа материалов этой таблицы является следующее. Очевидно, что выведение азота в виде мочеви́ны является энергетически более выгодным для организма животного, чем в виде мочева́й кислоты и аллантаина, т.е. млекопитающие, как эволюционно более совершенные организмы, осуществляют выведение азота с меньшим сопутствующим количеством энергии. Выделение энергии на единицу азота резко возрастает при патологии (белок в моче) или при выведении токсичных веществ. Поскольку в норме безазотистые органические вещества, в том числе углеводы, в моче практически отсутствуют (2, 10), то причиной изменения величины показателя энергия/азот обычно являются изменения спектра азотсодержащих веществ. Следует, однако, учитывать возможность присутствия в моче углеводов, в частности лактозы, у глубоководных и новотельных коров (6), что может исказить картину.

Таблица 3. Характеристика основных азотсодержащих веществ мочи

Вещество	Молекулярная масса	Число атомов N	Число атомов C	C/N*	Калорийность		
					кДж/моль	кДж/г	в расчете на 1г азота
Мочевина	60	2	1	0,43	664**	11,1	23,8
Мочева́я кислота	168	4	5	1,07	2089**	12,4	37,3
Креати́нин	129	3	4	1,14	2380**	18,5	56,6
Ксанти́н	152	4	5	1,07	2425**	16,0	43,3
Аллантаин	158	4	4	0,86	1840***	11,6	32,9
Гиппу́ровая кислота	179	1	9	7,71	4485***	25,1	320
Фенацету́ровая кислота	193	1	10	8,57	5175***	26,8	370
Белок				3,32		23,8	149

*Примечание: * – отношение по массе; ** – табличные данные; *** – по расчетам автора с использованием материалов, содержащихся в руководстве Мецлера (9). Расчет проведен по числу электронов, переходящих к кислороду при окислении соединения.*

Результаты анализа характера распределения показателя C/N в моче лактирующих коров (n = 76) показаны в таблице 4. При анализе всей выборки явно просматривается ее неоднородность. В правой части

присутствует небольшая группа вариантов, не относящаяся к основной группе. Возможно, это случаи, когда моча содержала углеводы. После исключения величин, выходящих за 2σ , получена вторая выборка, которую, в принципе, можно считать однородной, хотя она и несколько асимметрична. Выборка имеет следующие характеристики: $M = 1,232$, $\sigma = 0,303$, $m = 0,036$. Левое ее крыло начинается с класса 0,51-0,75, что несколько превышает величину C/N для мочевины (0,43).

Таблица 4. Распределение проб мочи лактирующих коров по соотношению в них C/N (доля от всей выборки, %). Шаг равен 0,25

Границы классов															
0,51	0,76	1,01	1,26	1,51	1,76	2,01	2,26	2,51	2,76	3,01	3,26	3,51	3,76	4,01	4,26
0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	2,25	2,50	2,75	3,00	3,25	3,50	3,75	4,00	4,25	4,50
Полная выборка															
6,8	16,9	20,8	29,6	14,2	1,3	5,2	-	-	-	1,3	1,3	1,3	-	-	1,3
Выборка с исключением вариантов, выходящих за 2σ															
7,2	17,8	21,9	31,2	15,0	1,4	5,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Структура выборки из 77 проб мочи лактирующих коров по калорийности в расчете на 1 г азота до и после исключения проб, выходящих за $\pm 2\sigma$, представлена в таблице 5. Параметры второй выборки следующие: $M = 13,16$, $\sigma = 3,15$ и $m = 0,38$. В данном случае явно имеет место асимметрия распределения. Правое крыло более растянуто, а левое резко ограничено 29,3 кДж/г азота. Если бы в выборке были пробы, содержащие только мочевины, то левое крыло было бы ограничено характеризующей мочевины величиной – 23,8 кДж/г. Примесь других азотсодержащих веществ несколько сдвинула левую границу вправо.

Таблица 5. Распределение проб мочи лактирующих коров по калорийности мочи в расчете на 1 г общего азота (доля от всей выборки, %). Шаг равен 16,74 кДж/г (2ккал/г)

Среднее значение класса, кДж/г															
34	42	50	59	67	75	84	92	100	109	117	126	134	142	151	159
Полная выборка															
8,2	17,8	17,9	24,6	13,7	6,8	2,7	1,4	1,4	-	-	2,7	-	1,4	1,4	-
Выборка с исключением вариантов, выходящих за 2σ															
8,6	18,6	20,0	25,7	14,3	7,1	2,9	1,4	1,4	-	-	-	-	-	-	-

Рядом исследователей (18-20, 22) высказано предположение, что определение объема экскреции дериватов пурина (аллантоин, мочевиная кислота, ксантин, гипоксантин) может являться косвенным методом оценки объема поступающего в двенадцатиперстную кишку микробного протеина, особенно нуклеиновых кислот.

Анализ зависимости показателя энергия/азот мочи от величины C/N выявил, что коэффициент корреляции между этими показателями равен +9,48 ($n = 77$; $P < 0,01$). Зависимость между этими показателями представляется прямой линией (рис. 1), описываемой формулой $Y = 4,2 + 42,2 X$, где X – соотношение по массе C/N, а Y – калорийность мочи в расчете на 1 г азота, кДж. Большинство точек графика имеет тяготение к зоне от 30 до 80 кДж/г азота и величине C/N до 2,0. Лишь единичные пробы имеют C/N свыше 3,0. Установленная прямолинейная зависимость между рассматриваемыми показателями является ценной в методическом отношении, так как позволяет с достаточно высокой точностью рассчитать величину любого недостающего показателя из трех рассматриваемых, при знании величины двух других. В связи со сказанным, показатель «калорийность мочи в расчете на 1 г экскретуемого азота» может использоваться для расчетного определения величины отношения C/N.

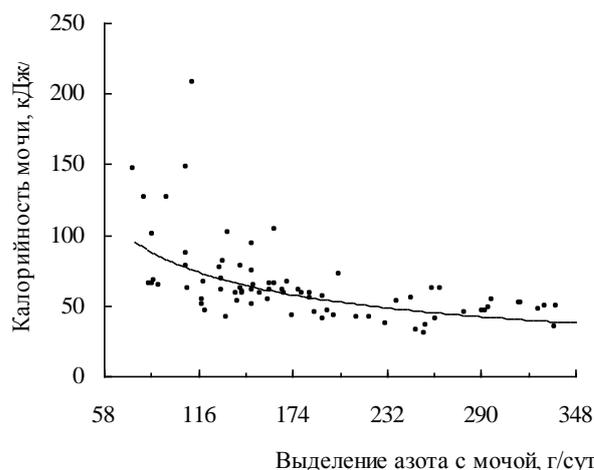


Рис. 1. Зависимость калорийности мочи в расчете на единицу азота (кДж/г) от выделения азота с мочой, г/сут

При анализе зависимости показателя энергия/азот мочи от условий протеинового питания выявлена явная тенденция к увеличению показателя по мере уменьшения количества выделяемого азота (рис. 2). По-видимому, при уменьшении потребления азота с кормом и, соответственно, количества выводимого с мочой азота, в моче существенно возрастает доля аллантаина и продуктов детоксикации. Напротив, образование мочевины за счет аммиака, всосавшегося из пищеварительного тракта, в этой ситуации резко снижается. По-видимому, такая зависимость должна более резко проявляться у жвачных в связи с исключительно важной ролью микрофлоры в пищеварении. Рассматриваемая

зависимость описывается эмпирической формулой $Y = X/(-6,62102 + 0,1176X)$, где Y – калорийность мочи в расчете на г азота (кДж/г азота); X – выделение азота с мочой, г/сут.

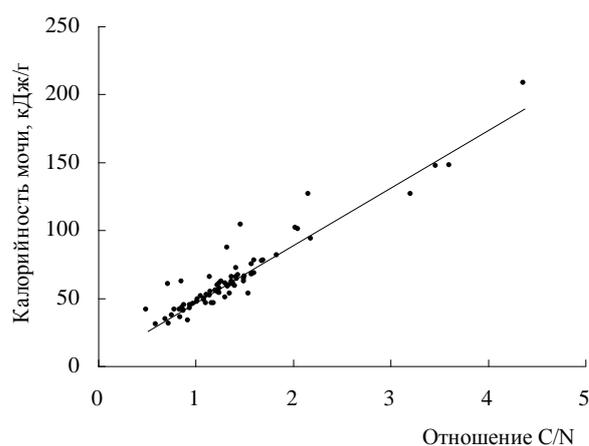


Рис. 2. Зависимость калорийности мочи в расчете на единицу азота от отношения C/N

Исходя из вышесказанного, можно сформулировать принцип использования отношения энергия/азот в опытах по питанию в качестве косвенного показателя объемов разрушения протеина корма в преджелудках с образованием аммиака и интенсивности деятельности микрофлоры. При уменьшении всасывания аммиака из преджелудков происходит уменьшение объемов синтеза мочевины и, соответственно, доли азота мочевины в общем азоте мочи. В результате можно ожидать увеличение отношения.

Иллюстрацией возможности использования показателя «энергия/азот мочи» могут служить результаты исследований энергетического обмена у коров при скармливании обработанных формальдегидом кормов (табл. 6). Обработка корма формальдегидом вызывала снижение деградируемости протеина корма в рубце и, при достаточной дозе, существенное снижение концентрации аммиака в содержимом рубца. Дополнительным фактором может быть угнетающее влияние формальдегида, при достаточно высоких его дозах, на деятельность микрофлоры. Условия опыта более подробно описаны в ранее опубликованных работах (16, 17).

При рассмотрении данных таблицы видно, что использование обработанных формальдегидом кормов сопровождалось закономерным увеличением, по сравнению с контролем, отношения энергия/азот мочи в I, II и III опытах. В опыте III, однако, этот эффект отсутствует при

сравнении рационов 1 и 2. Причиной этого является то, что для обработки кормов рациона 2 использована намного меньшая доза формаль-

Таблица 6. Изменение отношения энергия/азот мочи при использовании обработанных формальдегидом кормов

Опыт	Рационы	Отношение энергия/азот мочи, кДЖ/г
I	1. НК	64,53±3,22
	2. ОК	73,28±5,44
II	1. НК	51,02±0,46
	2. ОК	49,00±4,98
	3. ОК	59,55±4,52
III	1. НК	60,89±1,72
	2. ОК	72,53±1,33
IV	1. НК	90,44±1,63
	2. ОК	77,92±1,67

Примечание: НК – контрольные рационы из нативных кормов, ОК – рационы с включением обработанных формальдегидом кормов

дегида, чем при обработке кормов рациона 3. Кажущейся аномалией являются результаты опыта IV. Рационы коров в этом опыте содержали большое количество силоса, имевшего очень высокую долю растворимого протеина. В данной ситуации обработка шрота (ОК рацион) снизила отношение энергия/азот мочи, по-видимому, за счет уменьшения доли в моче соединений микробного происхождения с большим, чем у мочевины, соотношением C/N и, возможно, веществ, требующих детоксикации.

Заключение

Представленные материалы свидетельствуют о зависимости количества, калорийности и химического состава мочи у коров не только от условий питания, но и физиологического состояния животных. Объем мочи в первую очередь определяется количеством экскретируемого с ней азота и лишь затем общим количеством потребляемой с кормом влаги. Установлено, что у глубокостельных сухостойных коров, по сравнению с лактирующими, калорийность мочи в среднем в 1,24 раза выше. У них также достоверно выше доля валовой энергии мочи в «видимо переваренной» энергии (в среднем 8,3 и 4,5% соответственно).

Экскретируемые с мочой органические азотсодержащие соединения существенно различаются по содержанию энергии на единицу азота. Минимальное значение этого показателя у мочевины. Несколько выше он у аллантаина и намного выше – у продуктов детоксикации, выводимых с мочой. Между содержанием энергии в расчете на единицу азота и отношением количества углерода и азота в веществах мочи

имеет место прямолинейная зависимость, что позволяет, зная два из этих показателей, рассчитать недостающий.

С увеличением интенсивности кормления выделение энергии с мочой в расчете на единицу экскретированного азота снижается, что определяется увеличением доли мочевины, содержащей на единицу азота минимальное количество энергии по сравнению с другими органическими азотсодержащими веществами мочи. Доля энергии мочи в «видимо переваренной» энергии при увеличении уровня кормления закономерно снижается. При низком уровне питания, напротив, возрастает доля веществ с более высоким содержанием энергии. По-видимому, это соединения микробного происхождения и продукты детоксикации. Соответственно, уменьшение объемов образования аммиака в преджелудках также обычно сопровождается повышением калорийности мочи в расчете на единицу азота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афонский С.И. Биохимия животных. М.: Сов. энциклопедия. 1960: 573-588.
2. Белевич Е.И. Ферментация в рубце и эффективность использования пентозных и гексозных сахаров у жвачных животных: Автореф. дис. ...к.б.н., Боровск, 1978.
3. Брусенцева И.Е. Растворимость и расщепляемость протеина кормов Северного Зауралья и эффективность использования азота рационов при кормлении коров в период раздоя: Автореф. дис. ... к.с.-х.н. Омск, 1998.
4. Гефтер Ю., Смидович В. Вакат-кислород. Большая медицинская энциклопедия. 1958, 4: 864-867.
5. Денисов Н.И. Научные основы кормления коров. М.: Сельхозгиз, 1960: 440.
6. Жестоканов О.П. Лактозурия у лактирующих коров. Современные достижения физиологии и биохимии лактации. Л.: Наука, 1981: 227-228.
7. Калашников А.П., Щеглов В.В. Современные проблемы в оценке питательности кормов и нормирования кормления животных. Зоотехния, 1999, 6: 9-13.
8. Комков Н.А. Характеристика катаболизма тканевых белков в раннюю фазу лактации у коров. Дис. ... к.б.н., Боровск, 1996.
9. Мецлер Д. Биохимия, М.: Мир, 1980, 1: 200-227.
10. Морозова А.Ю. Энергетический обмен у телок при дополнительном введении энергии в виде глюкозы и ацетата. Дис ... к.б.н., Боровск, 1994.
11. Ноздрин Н.Т., Мысик А.Т. Обмен веществ и энергии у свиней. М.: Колос, 1975: 239.
12. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Под ред. Томмэ М.Ф. М.: Колос, 1969.
13. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие. Под ред. Калашникова А.П. и Клейменова Н.И. М.: Агропромиздат, 1985.

14. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве. М.: Колос, 1976.
15. Потребность жвачных в питательных веществах и энергии. Пер. с англ. под ред. А.П. Дмитроченко. М.: Колос, 1968: 336-367.
16. Решетов В.Б. Обмен энергии у коров при использовании обработанных формальдегидом кормов. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, 1993, 1(105): 3-10.
17. Решетов В.Б. Энергетический обмен у коров в связи с физиологическим состоянием и условиями питания. Дис. ... д.б.н., Боровск, 1998.
18. Antoniewicz A.M., Heinemann W.W., Hanks E.M. The effect of changes in the intestinal flow of nucleic acids on allantoin excretion in the urine of sheep. Protein metabolism and nutrition. – Braunschweig, FRG: EAAP publ., 1980, 27: 142-148.
19. Chen X.B. Novell Deb., Orskov E.R. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acids supply on purine derivative excretion by sheep. Br. J. Nutr., 1990, 63: 131-142.
20. Giesecke D. et al. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. J. Dairy Sci., 1994, 77: 2376.
21. Kiyoshi H., Naozumi T., Noriaki Y. Энергетический обмен у лактирующих коров. Nihon chikusan gakkaiho. Anim. Sci. and Technol., 1995, 66, 4: 374-382.
22. Lindberg J. et al. Excretion of purines in the urine of sheep in relation to duodenal flow of microbial protein. Swed. J. Agric. Rec., 1989, 19: 45.
23. Simecek K. Зависимость между содержанием азота и энергией в моче свиней. Сельское хозяйство за рубежом. Животноводство, 1969, 9: 16-17.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ КОРМЛЕНИЯ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ НА ПОСТУПЛЕНИЕ УГЛЕВОДНО-ЛИПИДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КРОВЬ ПОРТАЛЬНОЙ ВЕНЫ

А.В. Лысов, Д.Е. Панюшкин, В.М. Мартюшов, Л.Н. Вострова, Н.А. Гаранина

На фоне различного уровня кормления лактирующих коров исследована концентрация метаболитов углеводно-липидного обмена в крови воротной вены и артерии. Изменение уровня кормления достигалось различным содержанием в рационе основных питательных веществ и, в том числе, крахмала. Проведенные исследования позволили решить ряд вопросов, связанных со значительным варьированием поглощения некоторых метаболитов (в частности летучих жирных кислот) портальной системой крови.

Введение

Проблема повышения эффективности использования кормов животными с целью увеличения уровня и качества получаемой от них

продукции является одной из важнейших задач с.-х. биологической науки. Разрабатываемая в настоящее время в институте система питания высокопродуктивных коров на основе субстратного обеспечения метаболизма, призвана облегчить решение этой важной задачи. Разработка новой системы оценки рационов, основанной на анализе субстратной обеспеченности метаболизма молочных коров, требует исследования ряда важных параметров оценки кормов для уточнения прогноза образования субстратов конечных и промежуточных реакций межклеточного обмена веществ, получаемых в результате пищеварения и использования животными питательных веществ корма.

Концентрированные корма в рационах высокопродуктивных коров составляют до 55-60% энергетической питательности рациона и включают до 60-80% крахмала, потребляемого животными. Крахмал является главным компонентом, определяющим энергетическую ценность зерна и фактором, активно влияющим на синтез белка микроорганизмов (4, 7, 16). В настоящее время во многих странах ведутся исследования по изучению влияния крахмала на рубцовый метаболизм жвачных животных. При этом используются как добавки чистого кормового крахмала в составе рациона (3, 13), так и его инфузирования в рубец и сычуг (8). Немаловажное место занимают исследования, направленные на определение влияния крахмала, поступающего в составе различных зерновых культур (14).

По литературным данным известно, что коэффициенты образования и транспорта летучих жирных кислот из крахмала варьируют в широких пределах, что, прежде всего, связано с увеличением доли концентрированных кормов в рационе от 10 до 60%, изменением компонентного состава клетчатки (особенно при низком уровне концентрированных кормов в рационе) и способом обработки корма (11). Однако, эти коэффициенты должны уточняться, так как по имеющимся в нашем распоряжении данным, они не всегда объективно отражают объёмы поступления метаболитов в реальных условиях. Также при расчетах использования углеводных и липидных метаболитов из компонентов рациона по математической модели, некоторые рационы дают заметную ошибку, которая может быть идентифицирована и устранена только в экспериментах на животных. В связи с этим необходимы исследования по выявлению уровня всасывания в воротную вену ЛЖК и усвоения других метаболитов углеводно-липидного обмена при большом уровне концентратов и разном соотношении крахмала в рационах.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проведены на трех коровах-аналогах холмогорской породы, в первой и второй половине лактации. Зоотехническая характеристика подопытных животных представлена в

таблице 1. Масса коров в течение эксперимента изменялась незначительно. Коров содержали в условиях вивария института, в стандартных стойлах на привязи. Поили коров из автоматических поилок при трехразовом кормлении и доении.

Таблица 1. Характеристика подопытных животных

№ коровы	Масса тела, кг	Суточный удой ,кг и % жира, по сериям опыта											
		1		2		3		4		5			
3	487,5	22,1	3,2	19,1	3,1	17,2	3,2	12,4	3,7	12,2	3,8		
5	457	21,0	3,2	20,0	3,1	18,9	3,1	14,5	3,6	13,8	3,6		
6	488,5	22,8	3,3	21,18	3,2	19,0	3,3	15,2	3,5	14,8	3,5		
Среднее	477,67	21,98	3,23	19,77	3,13	18,36	3,2	14,06	3,6	13,62	3,63		

Схема кормления коров и состав экспериментального комбикорма представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Схема кормления коров

Корма, кг	Серии эксперимента				
	1	2	3	4	5
Сено	4,5	4,5	4	2	2
Силос	24	24	20	20	10
Свекла	10	10	–	–	–
Комбикорм	7,2	6,2	8	8	8

Первую серию эксперимента проводили для получения исходных данных о коэффициентах синтеза ацетата и пропионата при скармливании рациона, в состав которого включали комбикорм с добавлением 2 кг картофельного крахмала (20% по ОЭ от начального содержания в рационе). Во второй серии эксперимента коровы получали на 1 кг крахмала меньше, чем в первой серии (10% по ОЭ от начального содержания в рационе). Таким образом, определяли влияние скармливания дополнительного количества крахмала (1 кг) на молочную продуктивность и потоки метаболитов в воротной вене у лактирующих коров. В 3-й серии опыта в качестве комбикорма скармливали ячменную дерть с дополнительными минеральными добавками. Далее, на 4-м этапе опыта в рационе уменьшали количество сена (на 2 кг) и в 5-й серии 10 кг силоса, то есть изучали не только влияние изменения качества крахмала (3-серия эксперимента), но и влияние изменения структуры рационов (4-5 серии экспериментов) на молочную продуктивность и поток метаболитов у коров.

Целью исследований было изучение особенностей мобилизации эндогенных источников энергии и их вклада в энергетический обмен у лактирующих коров в начале лактации, а также разработка способа на-

правленной регуляции интенсивности освобождения эндогенных источников с учетом обеспеченности метаболизма субстратами. Кроме того, проводили уточнение параметров всасывания метаболитов углеводно-липидного обмена при различных уровнях кормления лактирующих коров и выявляли устойчивые коррелятивные связи между потоками всасывающихся субстратов.

Таблица 3. Состав комбикорма, %

Компоненты комбикорма	Серии эксперимента		
	1	2	3-5
Шрот соевый	48,6	56,4	-
Дерть ячменная	20,4	24,3	96,8
Крахмал картофельный	27,8	16,1	-
Соль поваренная	1,6	1,6	1,6
Трикальцийфосфат	1,6	1,6	1,6

Снижение количества основных питательных веществ рациона между 2-м и 1-м периодами опыта составило: по обменной энергии - 8,76%, сухому веществу - 6,01%, сырому протеину - 0,14%, переваримому протеину - 0,11%, сырому жиру - 0,43%, сырой клетчатке - 0,61%, крахмалу - 33,38%, сахарам - 0,16%. Между 3-м и 2-м периодами: 14,14%; 8,85%; 30,50%; 24,99%; 3,55%; 13,10%; 95,44%; 79,99%; соответственно. Между 4-м и 3-м периодами: 7,79%; 10,52%; 7,67%; 5,09%; 11,14%; 17,37%; 0,95%; 19,70%; соответственно. Между 5-м и 4-м периодами: 16,78%; 19,64%; 22,40%; 21,71%; 23,15%; 32,29%; 1,07%; 34,10%; соответственно.

Процентное отношение концентрированных кормов от всего рациона по обменной энергии составило: в 1-м периоде опыта - 49,11%; во 2-м - 44,49%; в 3-м - 54,57%; в 4-м - 59,18% и в 5-й серии исследований - 71,12%. Большое соотношение концентратов в 5-м периоде опыта объясняется минимальным содержанием грубых и сочных кормов в рационе.

Животные были хирургически подготовлены для проведения эксперимента. Для этого они подвергались оперативному вмешательству по поводу наложения ангиостомической канюли на воротную вену (v. porta) для прижизненного отбора проб крови по методу, разработанному во ВНИИФБиП Заболотновым Л.А. Кроме того, животные имели лодочку на наружной сонной артерии (a. carotis externa), которая позволяла получать артериальную кровь.

Во время исследований у животных отбирали пробы крови: до кормления и через 2 и 5 часов после кормления для выявления среднесуточного транспорта метаболитов в артериальной и портальной крови.

Результаты исследований

В период эксперимента происходило снижение суточной продукции молока у лактирующих коров, что прежде всего связано с уменьшением в рационе обменной энергии и основных питательных веществ, а также сроком лактации. Так, уменьшение количества крахмала на 1 кг во втором периоде опыта снизило продукцию молока в среднем на 10% (2,21 кг) при снижении уровня обменной энергии на 8,76% (16,66 МДж). Соответственно, содержание молочного жира закономерно возрастало, что согласуется с общей динамикой лактационной кривой.

Для проведения количественного анализа транспорта метаболитов углеводно-липидного обмена в кровь, расчетным методом определяли объемную скорость кровотока по воротной вене, с использованием математической модели, реализованной компьютерной программой «Metabol» (табл. 4).

Таблица 4. Кровоток воротной вены у коров, л/мин

№ коровы	Периоды				
	1	2	3	4	5
3	20,80	20,03	18,45	16,14	16,04
5	20,07	20,03	19,07	16,95	16,62
6	21,14	20,81	19,32	17,49	17,30
Среднее	20,67	20,29	18,95	16,86	16,65

Закономерно, что при снижении уровня обменной энергии в рационе, происходило и снижение скорости кровотока в воротной вене лактирующих животных.

Динамика летучих жирных кислот. Летучие жирные кислоты и глюкоза являются основными энергетическими компонентами крови, необходимыми для обеспечения организма энергией. Кроме того, ЛЖК оказывают значительное влияние на липидный обмен. Общеизвестно, что фактической единицей биосинтеза жирных кислот молока является малонил-КоА, который образуется из ацетил-КоА. Так же, из ацетил-КоА в печени и стенке рубца, в ходе цикла оксиметил-глутарил-КоА, образуются кетоновые тела. Из этого следует, что ЛЖК являются группой ключевых метаболитов интегрированных метаболических путей у коров во время лактации.

В условиях подвижного равновесия в открытой системе рубца осуществляется синтез и всасывание ЛЖК, а также их частичный переход в двенадцатиперстную кишку через систему преджелудков. К этим процессам присоединяется возможность взаимопревращений этой группы кислот. Если принять во внимание, что на объем содержимого

рубца влияет слюноотделение и проникновение воды, а часть кислот задерживается стенкой (9), то становится очевидной невозможность рассуждений об истинной продукции летучих жирных кислот и их использовании организмом животного только на основании их концентрации в рубцовой жидкости. Для этого необходимо изучить транспорт этих метаболитов портальной системой крови.

В наших исследованиях получены количественные данные о содержании и использовании летучих жирных кислот в артериальной и портальной системе крови лактирующих коров (табл. 5).

Таблица 5. Поступление ЛЖК в портальную кровь коров в различные периоды опыта

Периоды опыта	Содержание в крови, ммоль/л		ВАР, ммоль/л	Кэф. поглощ. (К=1-А/В)	Суточное потреб., г
	Артерия	Ворот. вена			
1	2	3	4	5	6
Сумма ЛЖК					
I период	1,520±0,162	2,511±0,258	0,991±0,165*	0,395	1903,21±311,10
II период	1,539±0,119	2,848±0,219	1,309±0,194*	0,460	2507,64±361,68
III период	1,696±0,275	3,023±0,439	1,327±0,267*	0,439	2386,50±486,25
IV период	1,773±0,436	2,675±0,623	0,902±0,346	0,337	1489,27±584,32
V период	1,651±0,115	2,606±0,238	0,956±0,154*	0,367	1508,02±255,17
Уксусная кислота					
I период	1,172±0,123	1,949±0,221	0,777±0,168*	0,399	1385,04±303,29
II период	1,165±0,100	2,116±0,179	0,951±0,162*	0,450	1669,05±284,54
III период	1,208±0,177	2,190±0,295	0,982±0,192*	0,448	1627,42±318,24
IV период	1,287±0,333	1,876±0,435	0,589±0,235	0,314	869,14±348,29
V период	1,086±0,074	1,758±0,161	0,672±0,109*	0,382	972,34±159,27
Пропионовая кислота					
I период	0,230±0,044	0,343±0,038	0,113±0,056*	0,328	247,63±123,08
II период	0,243±0,024	0,478±0,039	0,235±0,045*	0,491	508,64±96,39
III период	0,309±0,088	0,553±0,099	0,245±0,081**	0,442	499,68±166,03
IV период	0,287±0,089	0,499±0,114	0,212±0,093**	0,424	386,19±171,22
V период	0,371±0,035	0,583±0,052	0,212±0,042*	0,364	376,80±77,22
Масляная кислота					
I период	0,081±0,017	0,160±0,019	0,079±0,016*	0,493	204,60±41,42
II период	0,091±0,009	0,178±0,016	0,087±0,015*	0,487	224,43±38,87
III период	0,138±0,032	0,198±0,052	0,060±0,033	0,305	146,63±81,51
IV период	0,155±0,054	0,230±0,056	0,075±0,054	0,325	161,79±117,13
V период	0,149±0,011	0,206±0,035	0,057±0,028**	0,278	121,10±61,30
Изо-масляная кислота					

I период	0,0107±0,0021	0,0182±0,0020	0,0075±0,0026*	0,414	19,52±6,90
II период	0,0100±0,0014	0,0225±0,0040	0,0125±0,0041*	0,556	32,19±10,50
III период	0,0096±0,0030	0,0182±0,0031	0,0086±0,0043**	0,474	20,93±10,51
IV период	0,0111±0,0029	0,0117±0,0024	0,0006±0,0028	0,058	1,32±6,14
V период	0,0089±0,0019	0,0091±0,0013	0,0002±0,0012	0,023	0,46±2,53

продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
Изо-валериановая кислота					
I период	0,0092±0,0029	0,0160±0,0047	0,0068±0,0036**	0,426	20,46±10,86
II период	0,0129±0,0018	0,0226±0,0033	0,0097±0,0033*	0,430	28,99±9,83
III период	0,0123±0,0040	0,0277±0,0063	0,0154±0,0037**	0,556	43,38±10,33
IV период	0,0102±0,0055	0,0180±0,0044	0,0078±0,0037	0,433	19,62±9,44
V период	0,0113±0,0012	0,0167±0,0027	0,0054±0,0029**	0,324	13,33±7,13
Валериановая кислота					
I период	0,0089±0,0023	0,0135±0,0031	0,0046±0,0019	0,342	14,08±5,72
II период	0,0082±0,0010	0,0149±0,0020	0,0066±0,0023*	0,447	19,89±6,72
III период	0,0102±0,0031	0,0179±0,0013	0,0077±0,0030*	0,429	21,66±8,45
IV период	0,0117±0,0045	0,0213±0,0067	0,0096±0,0050	0,451	24,08±12,66
V период	0,0134±0,0018	0,0186±0,0025	0,0052±0,0023**	0,281	12,91±5,70
Капроновая кислота					
I период	0,0083±0,0026	0,0117±0,0023	0,0034±0,0022	0,293	11,88±7,73
II период	0,0084±0,0008	0,0156±0,0017	0,0072±0,0018*	0,462	24,46±6,21
III период	0,0098±0,0022	0,0181±0,0015	0,0083±0,0024*	0,461	26,79±7,72
IV период	0,0103±0,0034	0,0198±0,0046	0,0095±0,0031**	0,479	27,12±8,99
V период	0,0118±0,0017	0,0157±0,0027	0,0039±0,0022	0,252	11,09±6,12

P<0,01* ; P<0,05**

Как видно из таблицы, при уменьшении доли крахмала в рационе на 1 кг, происходит парадоксальное увеличение поглощения всех летучих жирных кислот в воротной вене, при их практически мало-варьирующем уровне в артериальной крови. Так, концентрация уксусной кислоты в воротной вене во 2-м периоде исследований достоверно возросла на 8,5%, что выразилось в увеличении суточного поглощения на 284,01 г. Концентрация пропионовой кислоты на 39,3% и 261,01 г; бутирата на 11% и 19 г; изо-масляной кислоты на 23,65 и 12,67 г; изо-валериановой на 41,3% и 8,53 г; валериановой на 10,3% и 5,81 г; капроновой на 33,3% и 12,58 г, соответственно.

Низкое поглощение летучих жирных кислот в первом периоде исследований можно объяснить тем, что 2 кг чистого картофельного крахмала являются нетипичным субстратом для рубцовой микрофлоры. Известно, что изменение уровня кормления сопровождается изменением процессов ферментации в преджелудках и кишечнике, что выражается в разном соотношении поглощаемых субстратов, их усвоении стенкой пищеварительно-

го тракта и поступлении в портальную кровь. О преобладающем транспорте крахмала в двенадцатиперстную кишку в первой серии эксперимента свидетельствует и высокий уровень поглощения глюкозы в этот период.

Многочисленные исследования (5, 6, 12) показывают, что в процессе переваривания крахмала снижается доля ацетата и повышается доля пропионата по отношению к общему количеству летучих жирных кислот. В нашем эксперименте установлено, что в первом периоде опыта отношение ацетат : пропионат : бутират составляло 75,4:13,5:11,1%, соответственно. Но уже во втором периоде исследований (при адаптации амилолитической микрофлоры) это соотношение изменилось и составило 69,5:21,2:9,3%. Такая же тенденция сохранилась и во всех последующих сериях эксперимента (3-й период – 71,5:22,0:6,5%; 4-й период – 61,3:27,3:11,4%; 5-й период – 66,2:25,6:8,2%), что свидетельствует о возрастании переваривания крахмала рациона в рубце.

В третьей серии опыта замена картофельного крахмала крахмалом дерти практически не вызвала существенных сдвигов в поглощении ЛЖК. Это, прежде всего, связано с более низкой распадаемостью данного вида крахмала в рубце (что возможно компенсировало его повышение в рационе), а также снижением количества грубых и сочных кормов (сено, силос, свекла). Некоторые изменения прослеживались только в поглощении изо-масляной кислоты (-11,26 г/сут, $P < 0,05$). Снижение суточного усвоения бутирата портальной кровью связано с повышением его концентрации в артериальной крови (на 51,6%) при возрастании содержания в крови воротной вены на 11,2% ($r = 0,51$, $P < 0,05$). Также в этот период наблюдалось достоверное повышение поглощения изо-валериановой кислоты на 14,39% ($P < 0,05$).

Известно, что вид потребленного корма способен изменить соотношение рубцовой микрофлоры и, тем самым, состав продуктов расщепления питательных веществ. Особенно большое влияние на это соотношение оказывает доля концентрированных кормов и содержание клетчатки в рационе. Снижение уровня клетчатки на 17,37% в 4-м периоде опыта привело к снижению поглощения суммы ЛЖК на 897,23 г, за счет снижения их концентрации в крови воротной вены на 0,348 ммоль/л (повышение артериальной концентрации на 0,0077 ммоль/л). Этот спад определялся уменьшением потребления уксусной, пропионовой, изо-масляной и изо-валериановой кислот. Поглощение масляной, валериановой и капроновой кислот напротив увеличилось.

Исключение из рациона 10 кг силоса вызвало снижение концентрации ЛЖК в крови воротной вены (кроме пропионата, +0,084 ммоль/л). Увеличение суточного поглощения ацетата в этот период связано с уменьшением его концентрации в артериальной крови на 15,6

% по сравнению с 4-м периодом исследований. В 5-й серии эксперимента не было резкого спада поглощения летучих жирных кислот портальной системой крови, что, прежде всего, связано с поступлением ацетата и, по-видимому, компенсаторными механизмами рубцовой микрофлоры, адаптирующейся к условиям изменения структуры рациона.

Динамика глюкозы. Наиболее существенным фактором, влияющим на скорость поступления глюкозы из желудочно-кишечного тракта, является уровень потребления корма. Процесс в значительной степени определяется и составом рациона. В течение всего эксперимента отмечалось значительное варьирование поступления глюкозы в кровь воротной вены лактирующих коров. Так, в первом периоде опыта отмечалась наиболее высокая концентрация этого метаболита в крови воротной вены – $49,967 \pm 3,204$ мг/100мл (табл. 6). Несмотря на то, что усвоение глюкозы в этот период сильно варьировало в зависимости от индивидуальных особенностей животных, прослеживалась общая тенденция высокого уровня ее потребления организмом коров. На этот процесс влияло поступление большого количества крахмала в тонкий кишечник (см. выше) и соответственно низкое усвоение пропионата, что согласуется с данными, полученными другими авторами (8).

Таблица 6. Поступление глюкозы в портальную кровь коров в различные периоды опыта

Периоды опыта	Содержание в крови, мг/100мл		ВАР, мг/100мл	Кэф. поглощ. (К=1-А/В)	Суточное потребл., г
	артерия	ворот. вена			
I период	47,446±1,388	49,967±3,204	2,521±2,520	0,050	743,13±754,56
II период	45,732±2,518	44,367±1,679	-1,365±2,815	–	-395,03±818,56
III период	50,112±0,555	49,048±0,536	-1,064±0,449	–	-292,14±123,92
IV период	40,850±3,169	44,266±2,766	3,416±1,427	0,077	844,33±354,93
V период	42,978±1,342	42,981±1,246	0,004±1,338	–	-1,64±331,15

Известно, что жвачные удовлетворяют большую часть своей потребности в глюкозе за счет глюконеогенеза. Наиболее важным предшественником глюкозы является образующийся в рубце пропионат, около 60-80% которого утилизируется в синтезе глюкозы, что обеспечивает ее образование на 50-70%.

Во 2-м периоде опыта отрицательное усвоение глюкозы связано, прежде всего, с уменьшением доли доступного крахмала и возросшим поступлением пропионата в портальную систему крови. Но при этом в различное время суток процесс всасывания может сменяться извлечением, на что указывает значительное варьирование венозно-артериальной разности ($\pm 2,815$ мг%). Несмотря на повышение концен-

трации глюкозы в крови воротной вены (на 10,5%), при исключении из рациона картофельного крахмала (3-й период опыта), ее концентрация в артериальной крови также возросла на 9,5%, что связано с практически одинаковым поглощением пропионата относительно второго периода исследований. Спад усвоения пропионовой кислоты при снижении доли клетчатки в рационе (4-й период) вызвал недостаток глюко-неогенных субстратов, что сказалось на понижении артериальной концентрации глюкозы на 18,5%. В этот период, несмотря на снижение уровня крахмала и сахаров в составе скармливаемых кормов и соответственно закономерного снижения концентрации всасываемой глюкозы в портальной крови, ее потребление возросло и было положительным у всех 3-х подопытных животных ($844,33 \pm 354,93$ г/сут).

В 5-й период исследований концентрация глюкозы в крови артерии повысилась на 2,128 мг%, а ее усвоение сильно варьировало в зависимости от индивидуальных особенностей животных. По-видимому, в этот период (снижение поглощения пропионата незначительно) наблюдался дефицит источников глюконеогенеза, что оказывало влияние на положительное всасывание глюкозы в портальную кровь в различное время суток, так как снижение продукции молока (и следовательно лактозы) у коров изменялось неравномерно. В целом венозно-артериальная разность в пятой серии эксперимента была незначительна.

Динамика кетоновых тел. Как энергетические метаболиты, кетоновые тела позволяют экономить глюкозу, которая синтезируется в процессе глюконеогенеза. До 20-30% углекислоты выдыхаемого воздуха может образовываться из кетоновых тел (10). За счет β -оксимасляной и ацетоуксусной кислот на 5-7% удовлетворяется энергетическая потребность организма. Кроме того, кетоновые тела могут использоваться для синтеза молочного жира. Наибольшее количество кетонов образуется в стенке рубца и печени. В рубцовом эпителии здорового жвачного животного кетоновые тела образуются из жирных кислот корма, преимущественно из масляной кислоты.

В ходе эксперимента динамика общих кетоновых тел в крови артерии и воротной вены в основном зависела от динамики β -оксимасляной кислоты ($r=0,977$ по артерии, $r=0,982$ по вене при $P<0,01$). Только в 3-м периоде поглощение кетоновых тел отражалось возрастающим поступлением ацетоацетата (табл. 7).

Наиболее высокий уровень поступления β -оксимасляной кислоты в систему портальной крови, несмотря на сильное варьирование, отмечен в 1-й серии исследований (144,27 г/сут) при высоком уровне молочной продуктивности (21,98 кг/сут). Затем, при увеличении потребления ацетата организмом животных, концентрация β -оксибутирата в артериальной и венозной крови коров снижалась (на

4,2% по артерии и 9,6% по воротной вене). В 3-м периоде опыта, при исключении картофельного крахмала и свеклы из рациона, уменьшалась и суточное поступление β -оксимасляной кислоты при повышении ее концентрации в крови артерии и воротной вены. В целом, со 2-го по 5-й период исследований, динамика β -оксибутирата в притекающей и оттекающей от желудочно-кишечного тракта крови имела динамическую взаимосвязь с концентрацией бутирата в этих сосудах ($r=0,330$ по

Таблица 7. Поступление кетонových тел в портальную кровь коров в различные периоды опыта

Периоды опыта	Содержание в крови, мг/100мл		ВАР, мг/100мл	Коеф. поглощ. (K=1-A/B)	Суточное потребл., г
	артерия	ворот. вена			
Общие кетонových тела					
I период	5,533±0,829	6,258±0,569	0,725±1,211	0,116	158,06±265,11
II период	5,196±0,306	5,666±0,556	0,470±0,447	0,083	100,33±95,69
III период	5,408±1,054	5,669±0,894	0,261±0,915	0,046	52,04±184,92
IV период	8,263±4,146	8,554±2,447	0,291±0,373	0,031	53,85±67,79
V период	5,623±0,395	6,030±0,543	0,407±0,677	0,068	70,08±120,49
β -оксимасляная кислота					
I период	4,603±0,736	5,263±0,624	0,660±1,028	0,125	144,27±225,05
II период	4,413±0,271	4,763±0,423	0,350±0,388	0,073	74,55±83,36
III период	4,742±1,038	4,802±0,781	0,061±0,879	0,013	11,52±177,5
IV период	7,113±3,309	7,015±2,102	-0,098±0,276	–	-16,87±50,42
V период	4,707±0,393	4,982±0,584	0,275±0,720	0,055	46,66±128,17
Ацетоуксусная кислота					
I период	0,930±0,171	0,994±0,223	0,065±0,162	0,065	13,79±35,12
II период	0,783±0,145	0,904±0,181	0,120±0,181	0,133	25,77±38,65
III период	0,667±0,229	0,867±0,150	0,200±0,268	0,231	40,52±54,26
IV период	1,150±0,525	1,539±0,253	0,389±0,066	0,253	70,72±11,87
V период	0,917±0,102	1,049±0,238	0,132±0,111	0,126	23,43±19,69

артерии, $r = 0,357$ по вене при $P<0,05$). При увеличении утилизации масляной кислоты в 4-м периоде опыта, на 50% возрастала артериальная концентрация β -оксибутирата (по вене на 46,1%), что вызывало прекращение его поступления из стенки ЖКТ. Полученные данные согласуются с исследованиями, проведенными лабораторией межточечного обмена веществ в 1992 году, в которых установлено, что при повышении артериальной концентрации β -оксимасляной кислоты свыше 6,0 мг%, ее венозно-артериальная разность становится отрицательной, то есть ингибируется ее синтез в стенке ЖКТ.

Поглощение β -оксимасляной кислоты в 5-й серии исследований недостоверно и сильно варьирует (снижение концентрации в артерии на 20,3%, в вене на 31,8%), что, по-видимому, связано с индивидуальной адаптацией коров к исключению из рациона 10 кг силоса и законо-

мерным уменьшением уровня бутирата в оттекающей от желудочно-кишечного тракта крови.

Утилизация ацетоуксусной кислоты портальной системой крови имела обратную направленность с поступлением β -оксибутирата. Наиболее высокое суточное потребление ацетоацетата ($70,72 \pm 11,87$ г/сут) наблюдалось в 4-й серии опыта. В этот же период выявлена и его самая высокая концентрация в артериальной и венозной крови. При сопоставлении этих данных с высокой концентрацией в крови артерии β -оксимасляной кислоты, повышенным суточным поступлением глюкозы и уменьшением количества уксусной и пропионовой кислот в оттекающей крови, можно сделать вывод о том, что ацетоацетат в 4-й серии эксперимента активно использовался на энергетические потребности лактирующих коров.

Динамика общих липидов. Липиды являются основными метаболитами, участвующими в синтезе жира молока и накоплении резервов тела. Измерение поглощения липидов в воротной вене не может достоверно отражать уровень их поступления в организм животного из желудочно-кишечного тракта, так как значительная их часть транспортируется с лимфой (15). Это же относится и к притекающей артериальной крови – значительная масса некоторых метаболитов липидного обмена (фосфолипиды) выделяется в просвет ЖКТ с желчью. Существуют и некоторые другие пути поступления экзогенных липидов в кишечник.

Однако, прослеживаются некоторые закономерности поглощения метаболитов липидного обмена портальной системой крови. Так в 1-м и 2-м периодах опыта происходило положительное поглощение общих липидов (табл. 7). В 3-й серии эксперимента наблюдалось увеличение содержания липидов в артериальной крови (на 6,1%) и снижение в крови воротной вены (на 8,4%), что выразилось в отрицательном балансе венозно-артериальной разности. В 4-м периоде поглощение было недостоверным и сильно варьировало. При снижении в рационе доли силоса (5-я серия исследований) баланс липидов по оттекающей – притекающей крови к желудочно-кишечному тракту вновь стал отрицательным. Можно предположить, что все изменения в поглощении метаболитов липидного обмена организмом коров вызваны, прежде всего, изменением поступления липидов в лимфатическую систему, а также мобилизацией тканевых резервов тела.

Фосфолипиды – структурные компоненты клеточных мембран. Обмен фосфолипидов тесно взаимосвязан с обменом жиров. Они активно участвуют в процессах всасывания и транспорта липидных компонентов рациона. Наряду с эфирами холестерина фосфолипиды являются наиболее значительными в количественном отношении из всех классов общих липидов. Во втором периоде исследований наблюдалось

снижение поглощения фосфолипидов (на 803,77 г/сут), что, прежде всего, связано с увеличением их концентрации в артериальной крови. Установлено (1), что увеличение количества ацетата, образованного и поглощенного организмом коров, вызывает тенденцию к усилению печеночно-кишечного и артериального транспорта фосфолипидов. По-видимому, этим фактом можно объяснить повышение концентрации ФЛ (фосфолипидов) в крови артерии во 2-м и 3-м периодах опыта, а также снижение их поглощения и выделение в желудочно-кишечный

Таблица 8. Поступление классов липидов в портальную кровь коров в различные периоды опыта

Периоды опыта	Содержание в крови, мг/100мл		ВАР, мг/100мл	Коэф. погл. (К=1-А/В)	Суточное потребл., г
	артерия	ворот. вена			
Общие липиды					
I период	282,703±4,454	310,161±7,763	27,458±10,427*	0,089	5964,57±2252,01
II период	283,072±4,277	309,879±5,556	26,807±4,670*	0,087	5719,10±988,13
III период	300,467±5,086	283,712±0,919	-16,754±4,095*	-	-3385,28±829,18
IV период	295,235±2,754	293,745±8,466	-1,490±9,546	-	-277,09±1722,14
V период	298,968±3,509	282,539±3,263	-16,429±3,805*	-	-2921,96±680,91
Фосфолипиды					
I период	109,258±1,784	122,282±3,552	13,024±4,207*	0,107	2834,65±906,87
II период	112,379±2,024	121,898±2,095	9,519±2,483*	0,078	2030,88±526,99
III период	116,898±3,486	110,711±1,268	-6,187±2,003*	-	-1250,57±405,78
IV период	114,578±2,755	115,821±2,538	1,242±3,599	0,011	215,02±647,26
V период	113,988±1,147	106,385±1,579	-7,603±1,693*	-	-1345,0±301,08
Эфиры холестерина					
I период	117,431±2,341	129,411±3,544	11,980±5,583*	0,093	2595,16±1213,47
II период	118,621±1,938	129,172±2,427	10,551±2,372*	0,082	2252,20±503,247
III период	125,290±4,238	117,308±1,092	-7,982±2,428*	-	-1611,29±492,36
IV период	122,932±1,539	122,032±4,377	-0,900±5,127	-	-159,69±926,12
V период	124,536±2,441	118,644±2,380	-5,892±2,352*	-	-1048,33±422,1
Свободный холестерол					
I период	12,979±0,240	13,730±0,455	0,751±0,306	0,055	162,05±67,42
II период	10,558±0,352	12,347±0,532	1,789±0,759*	0,145	382,05±161,56
III период	10,217±0,734	11,229±0,597	1,012±0,835	0,090	206,07±169,01
IV период	11,893±0,298	12,112±0,535	0,219±0,785	0,018	37,55±142,43
V период	10,896±0,484	11,273±0,747	0,377±0,705	0,033	67,50±125,79
Триацилглицеролы					
I период	36,169±1,707	36,770±0,884	0,601±1,181	0,016	132,35±406,32
II период	33,296±0,983	38,519±1,349	5,224±0,942*	0,136	1111,90±200,181
III период	39,287±1,827	36,365±0,860	-2,921±1,366	-	-593,94±275,53
IV период	36,738±1,368	34,785±1,317	-1,954±1,283	-	-350,40±231,37
V период	40,526±1,060	37,499±0,891	3,027±1,104*	-	-544,71±196,27

НЭЖК

I период	6,867±0,194	7,968±0,570	1,101±0,571	0,138	240,36±124,37
II период	8,218±0,204	7,943±0,420	-0,275±0,333	–	-57,93±71,25
III период	8,775±1,128	8,099±0,285	-0,676±0,546	–	-135,54±110,40
IV период	9,033±0,215	8,996±0,284	-0,097±0,421	–	-19,56±75,52
V период	9,022±0,486	8,738±0,484	-0,284±0,424	–	-51,43±75,18

P<0,01 *

тракт. Отрицательное поглощение ФЛ в 3-й и пятой серии исследований и их недостоверное усвоение в 4-м периоде, вероятно, связано с их транспортом через лимфатическую систему.

Экзогенный и эндогенный холестерол при всасывании из тонкого кишечника связывается с жирными кислотами, в большей мере с пальмитиновой, и образует эфирсвязанный холестерол, концентрация которого в плазме крови более чем в 10 раз превышает содержание свободного холестерина. Динамика концентрации эфиров холестерина (ЭХ), в нашем эксперименте, полностью совпадала с динамикой содержания фосфолипидов во все периоды опыта ($r=0,640$ по артерии, $r=0,824$ по вене при $P<0,01$). Считается, что основным путем утилизации ФЛ и ЭХ является портальная система крови. Это согласуется с результатами, полученными в 1-й и 2-й серии эксперимента. Но при возрастании доли концентратов свыше 50% по обменной энергии рациона, начиная с 3-го периода исследований, по-видимому, возрастает транспорт этих метаболитов с лимфатической системой, что связано с усилением синтеза фосфолипидов в печени (1). Это наблюдение свидетельствует о том, что такие классы липидов как фосфолипиды и эфиры холестерина поступают в лимфатическую систему как неотъемлемый компонент хиломикронов.

Холестерол, как и фосфолипиды, является одним из важнейших компонентов клеточных мембран. Кроме того, он участвует в синтезе стероидных гормонов и желчных кислот. То есть, фактически холестерол относится к незаменимым компонентам живого организма. По-видимому, этим можно объяснить положительный баланс свободного холестерина по портальной системе крови во все периоды исследований. Значительное повышение утилизации этого метаболита во второй серии опыта (в 2 раза) связано со снижением его концентрации в артериальной крови на 18,6 % (по вене на 10%). Такая же тенденция отмечается и при переходе на 3-й рацион.

Липиды могут обеспечивать до 15% потребности организма в энергии. Значительная роль в этом процессе принадлежит триацилглицеролам (ТАГ). Они также являются основным компонентом молочного жира (98%). В тонком кишечнике, внутри эпителиальных клеток триацилглицеролы синтезируются из моно-, диацилглицеролов и жирных кислот путем этерификации. В 1-й серии эксперимента поглощение ТАГ сильно варьировало в зависимости от индивидуальных осо-

бенностей животных. Это наблюдение, а также отрицательный баланс оттекающей-притекающей крови в 3-5 периоде опыта, свидетельствует о преимущественном транспорте этих метаболитов в составе лимфы. Трудно объяснить резкое снижение артериальной и повышение венозной концентрации триацилглицеролов во второй серии эксперимента, что вызвало повышение венозно-артериальной разности до 5,224 мг%. По-видимому, это не связано с уменьшением доли крахмала в рационе, а может объясняться перераспределением потока ТАГ стенкой желудочно-кишечного тракта.

НЭЖК – доля общих липидов плазмы крови, обмен которых вносит вклад в энергетику животных. Неэтерифицированные жирные кислоты являются легкодоступным источником энергии, изучение которых необходимо для разработки системы субстратной обеспеченности метаболизма. Кроме 1-го периода исследований, в течение всего эксперимента наблюдалось отрицательное поглощение НЭЖК из желудочно-кишечного тракта. Известно, что в период пика лактации они поставляются в артериальную кровь из резервов тела даже при высоком уровне концентратов в рационе (2), чем и объясняется их высокая артериальная концентрация (свыше 8,5 мг%), а также отрицательная венозно-артериальная разность. Поступление неэтерифицированных жирных кислот в просвет ЖКТ свидетельствует об их использовании стенкой кишечника в процессах катаболизма и возможном включении в триацилглицеролы и другие метаболиты липидного обмена. Низкое содержание НЭЖК в артериальной крови на 1-м рационе (6,867 мг%), возможно, связано с недостаточным поступлением в это время летучих жирных кислот, и следовательно, с активным использованием НЭЖК на энергетические потребности организма, что вызывает их дополнительное поступление из крови воротной вены.

Заключение

Представленный экспериментальный материал характеризует поступление углеводно-липидных метаболитов из желудочно-кишечного тракта в кровь воротной вены при различном уровне снабжения лактирующих коров питательными веществами. На основе данных по содержанию метаболитов в портальной системе крови и артерии рассчитаны венозно-артериальная разность и коэффициенты поглощения веществ в венозную кровь. Представлена динамика транспорта метаболитов.

Как показали исследования на коровах по поступлению метаболитов в кровь, при всасывании терялось около 25%. Абсолютные значения образования и поглощения могут иметь неточности, поэтому анализ произведен в сравнительном аспекте по периодам опыта. В каждом случае стенкой пищеварительного канала поглощалась различная

субстратная смесь, сохранялось постоянство пропорции по отношению к ОЭ (25% и 25,8%).

Показано, что на спектр всасывающихся субстратов оказывает влияние не только количество образовавшихся субстратов, но и в каких соотношениях они поступают относительно их обеспеченности. Проведенные исследования показывали, что для расчета потребностей в отдельных метаболитах и практического обеспечения этих потребностей необходимо учитывать как потребности самой стенки ЖКТ, так и ее непосредственное активное участие в образовании питательной субстратной смеси для продуктивных органов.

Исследования охватывают наиболее важные аспекты взаимодействия метаболитов углеводного и липидного обменов и позволяют оценить не только их количественное поступление, но и его закономерности. Полученные данные будут использованы для уточнения прогноза образования субстратов конечных и промежуточных реакций межточного обмена веществ, получаемых в результате пищеварения и использования животными питательных веществ корма, что необходимо для разработки новой системы оценки рационов, основанной на анализе субстратной обеспеченности метаболизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев А.А. Липидный обмен и продуктивность жвачных животных. М: Колос. 1980: 183-248.
2. Решетов В.Б. Потребность молочных коров в энергии. Энергетическое питание сельскохозяйственных животных. 1987: 24, 9-17.
3. Beauchemin K.A., Yang W.Z., Rode L.M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, 1999, 82(2): 378-390.
4. Chen C.Y., Hsu J.T. The effects of starch and protein degradation rates, hay sources and feeding frequency on rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Proc. Natl. Sci. Coun. Repub. China B.*, 1998, 22(4):159-165.
5. De Visser H., Klop A., van der Meulen J., van Vuuren A.M. Influence of maturity of grass silage and flaked corn starch on the production and metabolism of volatile fatty acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81(4): 1028-1035.
6. Ekinici C., Broderick G.A. Effect of processing high moisture ear corn on ruminal fermentation and milk yield. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80(12): 3298-3307.
7. Huntington G.B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.*, 1997, 75(3): 852-867.
8. Knowlton K.F., Dawson T.E., Glenn B.P., Huntington G.B., Erdman R.A. Glucose metabolism and milk yield of cows infused abomasally or ruminally with starch. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81(12): 3248-3258.
9. Kristensen N.B., Danfaer A., Agergaard N. Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants. *Arch. Anim. Nutr.*, 1998, 51(2-3): 165-175.
10. Kronfeld D.S. Hypoglycemia in ketotic cows. Symposium ketosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1971, 54(6): 949-961.

11. Michalet-Doreau B., Philippeau C., Doreau M. In situ and in vitro ruminal starch degradation of untreated and formaldehyde-treated wheat and maize. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1997, 37(3): 305-312.
12. Overton T.R., Cameron M.R., Elliott J.P., Clark J.H., Nelson D.R. Ruminal fermentation and passage of nutrients to the duodenum of lactating cows fed mixtures of corn and barley. *J. Dairy Sci.*, 1995, 78(9): 1981-1998.
13. Philippeau C., Le Deschault de Monredon F., Michalet-Doreau B. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. *J. Anim. Sci.*, 1999, 77(1): 238-243.
14. Plascencia A., Zinn R.A. Influence of flake density on the feeding value of steam-processed corn in diets for lactating cows. *J. Anim. Sci.*, 1996, 74(2): 310-316.
15. Sutton J.D. Digestion and absorption of energy substrates in the lactating cow. *J. Dairy Sci.*, 1985, 68(12): 3376-3393.
16. Vuuren A.M., Klop A., van der Koelen C.J., de Visser H. Starch and stage of maturity of grass silage: site of digestion and intestinal nutrient supply in dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, 1999, 82(1): 143-152.

ПОГЛОЩЕНИЕ ЛИПИДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗОЙ КОРОВ ПРИ РАЗНОМ УРОВНЕ ПИТАНИЯ

*Н.А. Гаранина, Д.Е. Панюшкин, Л.А. Заболотнов, А.В. Лысов,
Л.Н. Вострова, А.Е. Шмельков*
Лаборатория межклеточного обмена веществ

Определены количественные параметры использования липидных компонентов молочной железой на синтез молочного жира в двух сериях опыта на 2 группах первотелок при сравнительном нормировании питания по детализированным нормам и с учетом разработок института.

Введение

Особенности обмена веществ у лактирующих коров определяются функцией молочной железы, а молочная продуктивность, в свою очередь, обусловлена способностью организма коров трансформировать энергию потребленного корма в энергию молока. В используемой ранее системе нормированного питания животных (1) недостаточно полно оценивается уровень клетчатки и ее составляющие компоненты, степень деградиремости протеина, а также не учитывается субстратный комплекс всех питательных веществ, в частности, общих липидов и их фракций : свободный и связанный холестерол, триацилглицеролы, фосфолипиды и неэстерифицированные жирные кислоты.

Исследования нашей лаборатории (2) при инфузии субстратной смеси в рубец и двенадцатиперстную кишку показали, что основным предшественником преформированных жирных кислот являются триацилглицеролы, являющиеся основным компонентом в биосинтезе жира молока, хотя роль таких максимальных в количественном отношении фракций, как фосфолипиды и эфиросвязанный холестерол не исключена (3, 4).

Задачей данного эксперимента было определение количественного использования общих липидов и их компонентов молочной железы на синтез молочного жира у коров-первотелок при нормировании по детализированным нормам и разработкам института, выявление закономерностей артерио-венозной разности метаболитов по молочной железе и их взаимосвязи с синтезом основных компонентов молока.

Материал и методы

В виварии института было проведено 2 серии опытов на 8 лактирующих первотелках. Животные были оперированы с целью получения артериальной крови путем выведения сонной артерии под кожу. Коровы были разделены на 2 группы аналогов по живой массе и молочной продуктивности. Коров контрольной группы кормили согласно норм ВИЖа (1), а опытной группы – по нормам, рекомендуемым институтом. В рацион коров контрольной группы включали: сено злаково-разнотравное, силос разнотравный, комбикорм, состоящий из смеси ячменя и овса – 51%, кукурузы – 5%, соевого шрота – 7%, подсолнечникового шрота – 33%, соль и премиксы – 1%. Рацион коров опытной группы отличался составом комбикорма, включающего смесь ячменя и овса – 38%, (в отличие от контроля – 51%), кукурузы 30% – против контроля 5%, соевого шрота (труднодеградируемого) – 23%, подсолнечникового шрота (легкодеградируемого) – 5%, а соль и премиксы в тех же соотношениях. Рационы обеих групп коров были изокалорийными. Корректировку рационов проводили каждые 30 дней (табл. 1).

Таблица 1. Фактическое потребление питательных веществ рациона

Компоненты корма	Предвар. период	1 серия				2 серия	
		контроль		опыт		контр.	опыт
		1*	2*	1*	2*		
Сухое вещество, кг	16,08	16,7	16,4	16,6	15,9	15,5	16,4
Обмен. энергия, МДж	147,1	150,1	148,4	153,4	148	143,9	152,7
Сырой протеин, г	2144	2007	2031	2126	2084	2041	2254

Сырая клетчатка, г	3099	3287	3234	3008	2809	2847	3066
Крахмал, г	2293	1841	2077	2456	2636	1876	2665
Сахара, г	1104	1239	1252	1245	1248	1206	877
Сырой жир, г	600	689	665	601	546	659	655
Соль поваренная, г	76	70	70	81	81	77	91
Кальций, г	106	111	106	111	108	111	114
Фосфор, г	65,3	72,5	68,6	67,1	62	75	70

1* – задано; 2* – принято

В состав рациона коров обеих групп включали биологически активные вещества и премиксы в соответствии с нормой. В предварительный и далее в конце каждого периода эксперимента брали кровь из молочной вены и сонной артерии 2 раза в сутки – утром до кормления и затем через 3 часа после кормления с целью определения артерио-венозной разности метаболитов по молочной железе и определения ее потребности в общих липидах и липидных метаболитах. Учет удоя коров проводили ежедневно. В плазме артериальной крови и крови молочных вен определяли концентрацию общих липидов (6), классы липидных соединений методом тонкослойной хроматографии на силикагеле марки ЛС-254 (7) для установления артерио-венозной разности.

Результаты и обсуждение

Показано, что в предварительный период эксперимента концентрация общих липидов(ОЛ) в плазме артериальной крови коров контрольной и опытной групп составила соответственно $303,6 \pm 7,0$ и $293,5 \pm 8,5$ мг%, в крови молочной вены $285,8 \pm 6,4$ и $276,4 \pm 5,5$ мг%, т.е. молочная железа извлекала из артериальной крови 17,7 и 17,3 мг% общих липидов соответственно по группам и на образование 1 л молока было затрачено соответственно по группам $-57,6$ и $55,8$ мг% ОЛ (табл. 2).

В 1 серии эксперимента концентрация ОЛ в плазме артериальной крови коров контрольной группы, получавших соевый и подсолнечниковый шрот соответственно 7% и 33%, составила $290,3 \pm 4,0$ мг%, а в молочной вене – $271,9 \pm 3,6$ мг%, при артерио-венозной разности, равной 18,4 мг%. Через 3 часа после кормления отмечалась некоторая тенденция к увеличению концентрации общих липидов в артериальной крови и крови молочных вен, при равном количестве поглощенных липидов молочной железой из артериальной крови ($18,4 \pm 1,9$ и $18,6 \pm 0,9$ мг%) и при равном использовании ОЛ на образование 1 л молока.

В этой серии эксперимента концентрация ОЛ в плазме артериальной крови коров первотелок опытной группы, получавших 23% соевого и 7% подсолнечникового шрота в состоянии до кормления по сравнению с контролем повысилась на 9,6 мг%, в молочной вене – на

7,8 мг%, что привело к повышению артерио-венозной разности на 9,8 мг%. Затраты ОЛ на образование 1 л молока были выше в опытной группе на 5,9 г.

Таким образом, увеличение артерио-венозной разности ОЛ в плазме артериальной крови и крови молочной вены коров опытной группы на 10% (20,35 мг% против контроля 18,45 мг%) обусловлено разным количественным соотношением и степенью деградируемости шрота. Труднодеградируемый в рубце соевый шрот и легкодеградируемый подсолнечниковый (5% в опыте и 33% в контроле) способствовал лучшему всасыванию в стенке кишечника питательных веществ, в том числе липидных метаболитов. Увеличилось поглощение общих липидов на образование 1 л молока в опытной группе по сравнению в контролем на 6,5 мг% или на 10,32%, т.е. рацион коров опытной группы более полно обеспечивал их потребность в субстратах.

Во 2-й серии эксперимента отмечалась аналогичная тенденция. При смене рационов кормления (коровы контрольной группы стали получать рацион опытной группы и наоборот) установлено, что молочная железа поглощала 19,6±0,4 мг% ОЛ. Через 3 часа после кормления уровень липидов оставался почти прежним и степень поглощения их молочной железой составляла 19,30 мг% (табл. 2). Содержание ОЛ как в плазме артериальной крови коров опытной группы, так и молочных вен было значительно выше, по сравнению с таковым контрольной группы. Молочная железа поглощала 21,5±0,6 мг% ОЛ в состоянии до кормления, что выше на 10,1 % по сравнению с контролем в этот же период. Через 3 часа после кормления концентрация ОЛ в артериальной крови опытной группы была на 4,9 % и в молочной вене на 4,10% выше по сравнению с таковым контрольной группы. Молочная железа поглощала в большей степени ОЛ и на образование 1 л молока требовалось 69,7±2,20 г ОЛ (до кормления) и 72,7±1,2 г (после кормления).

Таблица 2. Использование общих липидов молочной железой коров-первотелок при разном уровне питания

Условия опыта	Гр.	Содержание метаболитов, мг%		АВР, мг%	К=1-В/А	Потребление на 1 л молока
		артерия	мол. вена			
Предварит. период	К	303.6±8.0	285.9±6.4	17.7±2.9	0.0576±0.0089	57.6±9.4
	О	293.5±8.5	276.4±5.5	17.1±3.9	0.0569±0.0119	55.7±12.7
1-я серия						
До кормл.	К	290.3±4.0	271.9±3.6	18.4±1.9	0.0633±0.0061	59.9±6.0
После кормл.	К	308.3±6.3	289.7±5.9	18.6±0.9	0.0602±0.0024	60.3±2.8
До кормл.	О	299.9±9.1	279.6±7.8	20.2±2.2	0.0671±0.0061	65.8±7.0
После кормл.	О	298.0±6.7	277.5±6.8	20.5±2.3	0.0689±0.0079	66.7±7.5

2-я серия

До кормл.	К	301.2±3.6	281.6±3.8	19.6±0.4	0.0652±0.0018	63.6±1.4
После кормл.	К	303.3±3.8	284.0±3.9	19.3±0.3	0.0638±0.0015	62.7±1.0
До кормл.	О	316.4±3.5	294.8±3.3	21.5±0.6	0.0681±0.0019	69.7±2.2
После кормл.	О	318.0±5.1	295.7±4.9	22.4±0.4	0.0704±0.0011	72.7±1.2

Таким образом, анализ данных 2-й серии опыта показывает, что изменение А-В разности артериальной крови и крови молочной вены в сторону повышения в опытной группе на 12,85% (21,95 мг% в опыте и 19,45 мг% в контроле) приводит к увеличению поглощения общих липидов молочной железой на образование 1 л молока в опыте на 13,87% (71,2 г в опыте и 63,15 г в контроле). Изменение соотношения субстратов в рационе коров опытной и контрольной групп вызывало соответственно и количественное изменение всасывания питательных веществ и общих липидов в частности. Более полное обеспечение рациона коров опытной группы субстратами синтеза молочного жира способствовало всасыванию экзогенных липидов корма и большему поглощению общих липидов молочной железой (13,87%).

Показано, что концентрация фосфолипидов (ФЛ) варьировала в пределах 110,0-119,0 мг%, что составляет примерно от 36 до 40% их содержания в плазме артериальной крови и крови молочных вен от ОЛ.

В предварительный период эксперимента различий между концентрацией ФЛ в артериальной крови и крови молочных вен в контрольной и опытной группах практически не отмечено (рис. 1), хотя АВР в опытной группе была ниже на 0,88 мг% (рис. 2) и потребление ФЛ на образование 1 л молока в контрольной группе равнялось 15,9 г (рис. 3), в опытной группе – 12,99 г ФЛ (рис. 4).

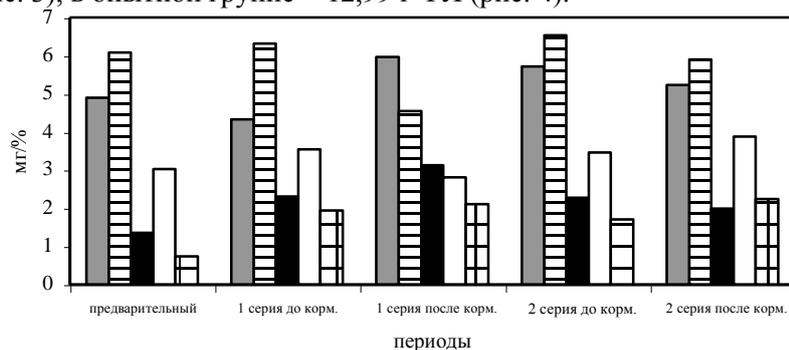


Рис. 1. Артерио-венозная разность липидных соединений (контроль)

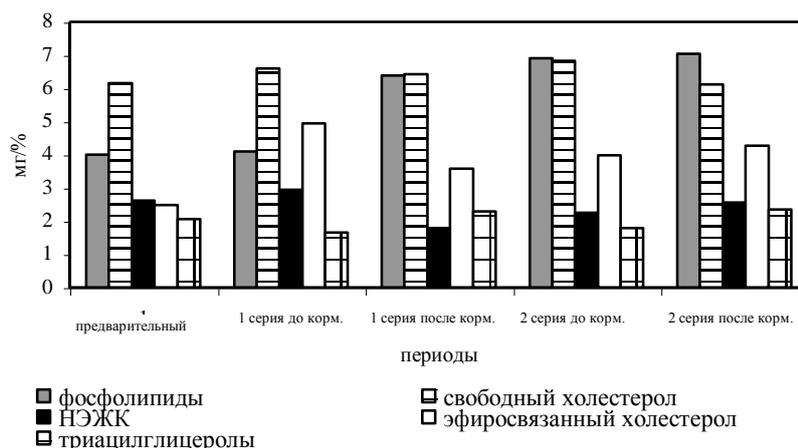


Рис. 2. Артерио-венозная разность липидных соединений (опыт)

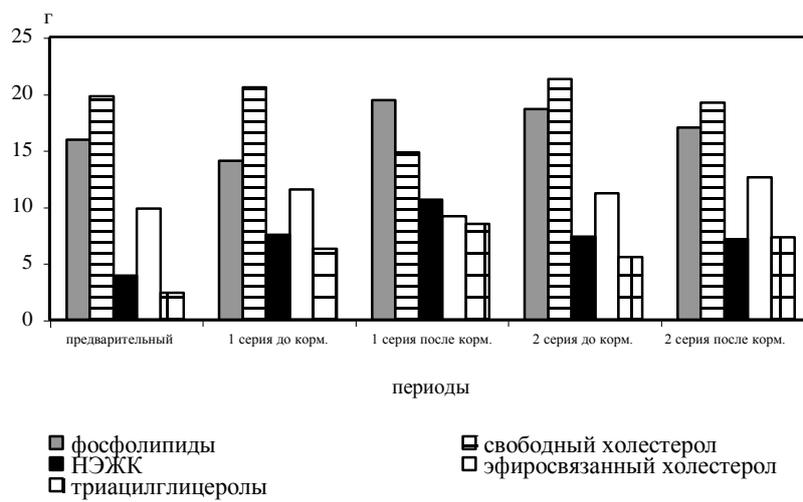
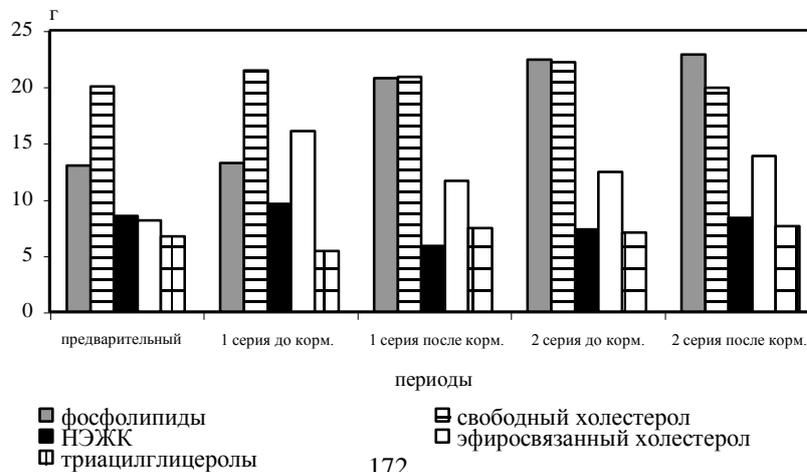


Рис. 3. Потребление липидных соединений в расчете на 1 л молока



(контроль)

Рис. 4. Потребление липидных соединений в расчете на 1 л молока
(опыт)

Концентрация ФЛ в артериальной крови контрольной и опытной групп превышала таковую в молочной вене, т.е. молочная железа постоянно поглощала их из крови. В 1-й серии эксперимента молочная железа поглощала из притекающей крови коров контрольной группы фосфолипиды в количестве 4,32 мг%. Через 3 часа после кормления степень поглощения их молочной железой увеличилась в 1,38 раза (рис. 1). На образование 1 л молока затраты составили 14,03 г – до кормления и 19,4 г – после кормления (рис. 3). В плазме крови молочных вен концентрация ФЛ была ниже у коров опытной группы как до кормления, так и после него. АВР составила соответственно $4,1 \pm 1,2$ и $6,4 \pm 0,8$ мг%. Спустя 3 часа после кормления затраты фосфолипидов на образование 1 л молока значительно увеличились (с 13,2 до 20,8 г ФЛ).

Во 2-й серии эксперимента отмечалась та же тенденция. У коров контрольной группы до кормления и после него степень поглощения ФЛ была примерно одинаковой – $5,7 \pm 0,6$ мг% до кормления и 5,2 мг% после кормления. Для образования 1 л молока потребовалось соответственно $18,6 \pm 2,0$ и $16,99 \pm 1,7$ г ФЛ (рис. 3). В этой серии эксперимента артерио-венозная разность продолжала увеличиваться. До кормления она равнялась $6,9 \pm 1,1$ и $7,0 \pm 1,1$ мг% (рис. 1) и потребление ФЛ на образование 1 л молока составило соответственно $22,4 \pm 3,7$ и $22,8 \pm 3,7$ (рис. 3).

Полученные нами незначительные изменения в концентрации фосфолипидов и их артерио-венозной разницы еще раз подтверждают, что эта многочисленная в количественном отношении фракция является довольно стабильной и оказывает опосредованное влияние на синтез молочного жира, являясь в большей степени поставщиком свободных жирных кислот. Например, в двух сериях опыта концентрация фосфолипидов в контрольной группе в среднем колебалась в пределах от 113,6 до 113,9 мг% в артериальной крови и от 107,8 до 107,5 мг% в молочной вене, а в опытной группе соответственно от 113,9 мг% до 119,2 мг% (артерия) и от 107,8 до 112,2 мг% (молочная вена). Довольно заметно увеличилось потребление ФЛ на образование 1 л молока. В первой серии в опытной группе через 3 часа после кормления оно увеличилось в 1,1 раза по сравнению с контролем, а во второй серии – в 1,34 раза соответственно. Концентрация свободного холестерина (СХ) в плазме артериальной крови и крови молочных вен колебалась в пределах от 6,3 до 16,0 мг% и изменялась в связи с разным количественным включением компонентов рациона.

В 1-й серии опыта у коров контрольной группы артерио-венозная разность имела положительную величину и молочная железа извлекала СХ из притекающей крови как до кормления ($2,3 \pm 0,4$), так и после него ($3,1 \pm 0,8$ мг%), что показано на рис.1 и на образование 1 л молока соответственно требовалось $7,5 \pm 1,3$ г и $10,6 \pm 2,6$ г СХ (рис. 3). У коров опытной группы в этой же серии АВР до кормления равнялась $2,9$ мг% (рис. 2) и на образование 1 л молока затраты составили $9,6 \pm 1,9$ г, а после кормления соответственно $1,8 \pm 0,3$ и $5,8 \pm 1,1$ г (рис. 4).

Во 2-й серии эксперимента концентрация СХ в плазме артериальной крови и крови молочных вен у коров контрольной и опытной групп варьировала примерно в тех же пределах и колебания артерио-венозной разности имели примерно тот же размах, что и в 1-й серии опыта. Если у коров контрольной группы до кормления АВР и использование СХ молочной железой составили $2,3 \pm 0,4$ и $7,4 \pm 1,2$ г., то после кормления соответственно $1,99 \pm 0,3$ и $7,1 \pm 0,9$ г СХ, т.е. данный метаболит не претерпевал резких колебаний (рис. 3).

Концентрация неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) при разной обеспеченности субстратами рациона коров в плазме артерии и молочной вены колебалась от $6,8 \pm 0,3$ до $10,9$ мг%. В предварительный период артерио-венозная разность у коров контрольной группы составила $0,7 \pm 0,2$ мг% (рис. 1), в опытной группе $2,1 \pm 0,9$ мг% (рис. 2).

В 1-й серии эксперимента у коров контрольной группы до кормления АВР равнялась $1,9 \pm 0,4$ мг% и на образование 1 л молока затраты составили $6,3 \pm 1,3$ г НЭЖК (рис. 3). После кормления поглощение данного липидного метаболита увеличилось на $9,3\%$ по сравнению с прежним состоянием, а у коров опытной группы этой же серии артерио-венозная разность увеличилась на $8,1\%$ по сравнению с контролем (рис. 2). Во 2-й серии эксперимента сохранялась та же закономерность – повышение концентрации НЭЖК после кормления, но более выраженное у коров опытной группы. Артерио-венозная разность в состоянии после кормления составила $2,3 \pm 0,5$, а затраты на образование 1 л молока $7,6 \pm 1,8$ г. Таким образом, увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот, их А-В разности и затрат на образование 1 л молока через 3 часа после кормления следует объяснить тем, что труднодеградируемый в рубце соевый шрот (23% в опытной группе против 7% в контроле), поступаая в тонкий отдел кишечника, подвергается в большей степени гидролизу. При этом НЭЖК, легко образуясь при гидролизе поступающего корма рациона, быстро всасывается в кровь и вовлекается в межклеточный обмен веществ.

Существенные изменения претерпевает фракция триацилглицеролов (ТАГ). В предварительный период опыта у коров контрольной группы концентрация ТАГ в крови артерии и молочной вены состав-

ляла соответственно $40,3 \pm 1,3$ и $37,3 \pm 1,1$ мг%, при этом молочная железа поглощала их в количестве $3,0 \pm 0,6$ г. Несколько ниже этот показатель был у коров опытной группы, при этом АВР составила 2,5 мг% (рис. 1). В 1-й серии эксперимента у коров контрольной группы до кормления и после него степень поглощения ТАГ их молочной железой имела довольно значительную величину – $3,5 \pm 0,5$ (до кормления) и $2,8 \pm 0,5$ мг (после него) и затраты на синтез 1 л молока были равны соответственно $11,5 \pm 1,6$ и $9,1 \pm 1,5$ г. У коров опытной группы в этой же серии в состоянии до кормления степень поглощения их молочной железой возросла в 1,39 раза по сравнению с контролем, а после кормления в 1,27 раза (рис. 2). Затраты ТАГ на образование 1 л молока представляли максимальную величину – $16,1 \pm 3,2$ мг% (до кормления) и 11,6 мг% (после кормления) (рис. 4). Во 2-й серии эксперимента, вследствие варьирования кормов рациона, концентрация ТАГ в крови артерии и молочной вены у коров контрольной группы колебалась в тех же пределах, что и в 1-й серии эксперимента, при этом АВР равнялась $3,5 \pm 0,4$ (до кормления) и $3,8 \pm 0,5$ мг% (после кормления) (рис. 2). У коров опытной группы увеличилась концентрация ТАГ как в артерии, так и в вене (рис. 3). Степень поглощения их молочной железой, а также затраты ТАГ на образование 1 л молока составили 12,44 г на 1 л молока (до кормления) и 13,86 г/л молока (после кормления).

Таким образом, во второй серии исследований усилилась деятельность молочной железы, увеличилась циркуляция крови через вымя, о чем можно судить по данным кровотока. Молочная продуктивность коров опытной группы была выше на 1,9-2,0 литра молока в сутки, чем в контрольной группе. Концентрация триацилглицеролов в артериальной крови и крови молочной вены увеличилась, что повлияло на количественное их использование молочной железой. Это подтверждает то, что основным источником в образовании жира молока являются ТАГ.

Фракция эфирсвязанного холестерина (ЭХ) составляет максимальную величину по сравнению с другими липидными соединениями – от 39 до 47% от общих липидов. Эфирсвязанный холестерол в организме образуется из свободного экзогенного холестерина и, связываясь с жирной кислотой, в основном пальмитиновой, образует эфирсвязанный холестерол. Его концентрация более чем в 10 раз превышала концентрацию СХ. Концентрация ЭХ в артериальной крови и крови молочных вен колебалась в пределах $116,2 \pm 2,8$ мг% – $129,0 \pm 2,0$ мг%. В предварительный период в артериальной крови коров контрольной и опытной группах она была выше, нежели в молочной вене и АВР при этом составила соответственно $6,1 \pm 1,7$ и $6,2 \pm 1,5$ мг% (рис. 1). Затраты ЭХ на образование 1 л молока составили соответственно по группам $19,8 \pm 5,6$ и $20,0 \pm 4,8$ г (рис. 1).

В 1-й серии эксперимента концентрация ЭХ у коров контрольной группы несколько повторяла динамику изменения предварительного периода, а у коров опытной группы она несколько варьировала в сторону увеличения АВР (рис. 2), что соответственно приводило к повышению использования их на 1 л молока (рис. 4). Во 2-й серии в крови артерии и молочной вены у коров опытной группы, наряду с увеличением концентрации в крови, отмечалось увеличение поглощения их молочной железой. На образование 1л молока требовалось $22,2 \pm 2,1$ г ЭХ до кормления и $19,9 \pm 2,6$ г ЭХ после него (рис. 4).

Заключение

Изменения концентрации общих липидов в плазме артериальной крови и крови молочной вены коров опытной группы обусловлено разным количественным соотношением и степенью деградируемости шрота. Труднодеградируемый в рубце соевый шрот (23% в опыте и 7% в контроле) и легкодоступный подсолнечниковый шрот (5% в опыте и 33% в контроле) в большей степени способствовали всасыванию в стенке кишечника питательных веществ, в том числе липидных метаболитов. Увеличилось поглощение общих липидов на образование 1 л молока в плазме крови опытной группы на 10,32% по сравнению с контролем т.е. рацион коров опытной группы более полно обеспечивал их потребность в субстратах.

Полученные незначительные изменения в концентрации и артерио-венозной разницы ФЛ подтверждают положение о том, что они оказывают опосредованное влияние на синтез молочного жира, являясь в большей степени поставщиками свободных жирных кислот. Например, изменение концентрации фосфолипидов в плазме крови коров контрольной группы в течение всего опыта находилось в пределах 113,6-113,9 мг% (артерия) и 107,8-107,5 мг% (молочная вена), а в плазме крови коров опытной группы соответственно от 113,9 до 119,2 мг% и от 107,8 до 112,2 мг%. Фракция свободного холестерина не претерпевала резких изменений, используясь, видимо, в большей мере как метаболит синтеза стероидных гормонов, желчных кислот. Эфирсвязанный холестерол более, чем в 10 раз превышал концентрацию свободного холестерина. В двух сериях опытов установлено повышение концентрации ЭХ в плазме артериальной крови и крови молочной вены крови у коров опытной группы. Незначительное изменение артерио-венозной разницы в течение всего опыта говорит о том, что данный метаболит оказывает косвенное влияние на молокообразование. Наибольшие изменения претерпевал активный метаболит – неэстерифицированные жирные кислоты. Увеличение их концентрации, артерио-венозной разницы и большее поглощение их молочной железой спустя 3 часа после

кормления из плазмы крови коров опытной группы объясняется тем, что НЭЖК, легко образуясь при гидролизе кормов рациона, быстро всасываются и вовлекаются в обмен веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Под редакцией акад. Калашникова и Клейменова. М., 1985.
2. Заболотнов Л.А., Гаранина Н.А. и др. Метаболизм в молочной железе у лактирующих и сухостойных коров. Сб. науч. тр. ВНИИФБиП, 1999, 38: 343-375.
3. Яковлев В.Г. Биохимия лактации. Фрунзе: Изд. АН Кирг. АССР, 1962: 112-174.
4. Овчаренко Э.В., Медведев И.К. Регуляция потребления корма у коров. В кн.: Энергетическое питание сельскохозяйственных животных. М: Колос, 1982: 90-99.
5. Заболотнов Л.А., Гаранина Н.А., Мартюшов В.М., Вострова Л.Н. Обмен метаболитов углеводно-липидного обмена между кровью и тканью молочной железы у коров. Сельхоз. биология, 1998, 6.
6. Folch et al. A sample method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 1957, 226: 497-509.
7. Орлов Л.В. Методические указания. Изучение липидного обмена у с.-х. животных. Боровск, 1986.

ЗАВИСИМОСТЬ УДОЕВ КОРОВ ОТ СОДЕРЖАНИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕКРЕТОРНЫХ КЛЕТОК В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ В РАЗНЫЕ ФАЗЫ ЛАКТАЦИИ

*М.И. Сапунов, П.В. Матющенко, З.Н. Макар, Р.И. Корнеева,
И.К. Медведев*

Лаборатория биохимии лактации

В раннюю фазу лактации молочная продуктивность коров зависит от количества железистых клеток в вымени и не коррелирует с функциональной активностью каждой из них. В этот период при средней продуктивности животных в 21 кг молока в сутки в их молочной железе содержится $3,86 \times 10^{12}$ секреторных клеток, обладающих способностью секретировать по $0,56 \times 10^{-8}$ г молока в сутки на клетку. В период между ранней и средней фазами лактации происходит снижение биосинтетической активности железистых клеток в вымени, которая в ходе дальнейшей лактации существенно не изменяется. С началом сухостойного периода биосинтетическая активность клеток молочной железы резко падает. Снижение удоев коров в середине

и в конце лактации связано главным образом с потерей секреторных клеток из вымени животных. В конце лактации молочная продуктивность коров зависит как от количества железистых клеток в вымени, так и от их секреторной активности.

Введение

Уровень молочной продуктивности животных определяется целым рядом факторов, все многообразие которых в конечном счете сводится к количеству секреторных клеток в молочной железе, функциональной активности каждой из них и обеспеченности биосинтеза компонентов молока необходимыми субстратами. В условиях сбалансированного кормления животных количество секретируемого ими молока должно зависеть главным образом от первых двух факторов. В научной литературе имеется много сведений, подтверждающих корреляцию молочной продуктивности животных с содержанием секреторных клеток в вымени (1, 2). Вместе с тем, значение каждого из указанных выше факторов в детерминировании величины удоев изучено недостаточно. Показано, что у коз оно может изменяться по ходу лактации (3). Возрастание удоев в послеродовой период до максимальных значений связывают с повышением биосинтетической активности секреторных клеток; постепенное снижение молочной продуктивности в среднюю фазу лактации – с гибелью секреторных клеток, а падение удоев в конце лактации – вновь с изменением биосинтетической активности клеток (3). В доступной научной литературе отсутствуют сведения о зависимости удоев коров от количества и функциональной активности железистых клеток в вымени в разные фазы лактации животных. Выяснение этого вопроса представляется важным как для обоснования путей повышения молочной продуктивности коров, так и для понимания механизма ее снижения в ходе лактации. В связи с этим целью работы явилась оценка количества и функциональной активности железистых клеток в вымени коров на разных стадиях лактации и изучение зависимости удоев животных от этих факторов.

Материалы и методы

В первой части работы определяли зависимость удоев коров от количества и секреторной активности железистых клеток в вымени. При этом были обобщены результаты анализов, выполненных в течение трех лет. Всего в этой части работы было использовано 12 коров, находившихся в начале (2-4 месяца) первой или второй лактации и 7 коров, находившихся в конце лактации (7-8 месяцев). Молочную железу брали при убое животных, предварительно измерив их удои. Определяли количество паренхимы в железе и тотальное содержание в ней

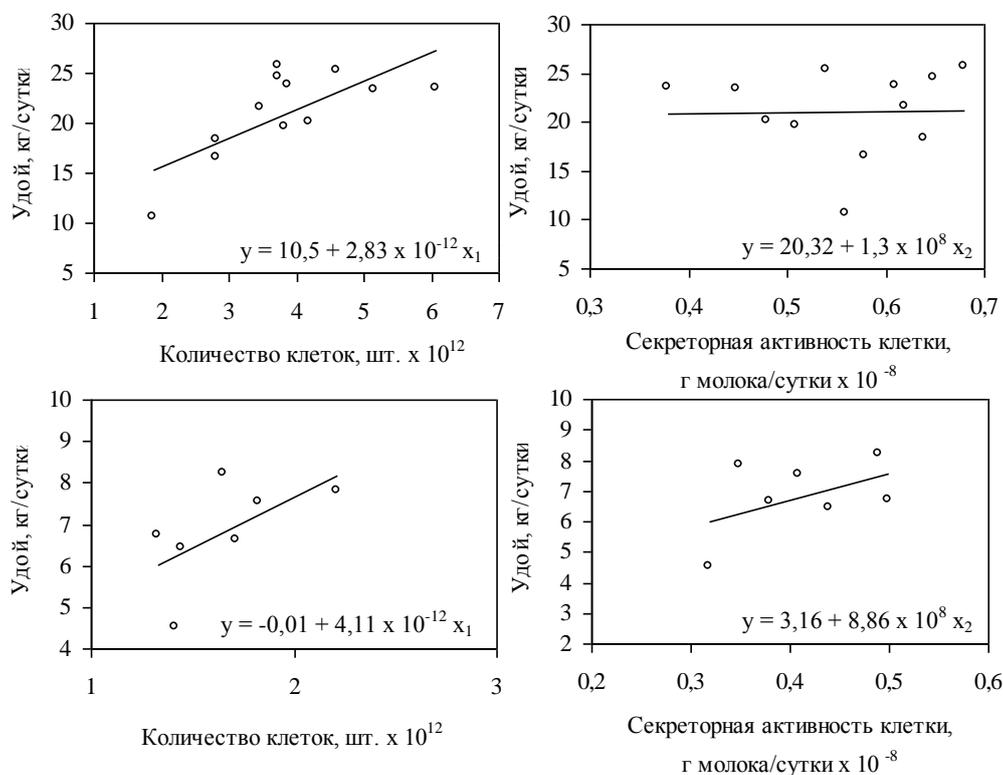
ДНК. Рассчитывали количество секреторных клеток в паренхиме, принимая, что на их долю приходится 80% ДНК паренхимы (4) и, что каждая клетка содержит 6×10^{-12} г ДНК (5). Секреторную активность каждой из клеток оценивали, относя суточный удой животных к содержанию железистых клеток в вымени. Рассчитывали коэффициенты корреляции молочной продуктивности коров с количеством секреторных клеток в вымени и с их функциональной активностью и составляли уравнение регрессионной зависимости между этими показателями (6).

Во втором опыте для оценки изменений в ходе лактации секреторной активности клеток молочной железы у одних и тех же животных (4-х коров и 4-х коз) в разные сроки лактации методом биопсии брали ткань молочной железы. О секреторной активности клеток судили по величине отношения концентрации в ткани РНК к концентрации ДНК.

Во всех опытах концентрацию ДНК в ткани определяли по методу Бартона (7), а концентрацию РНК – по реакции с орцином (7).

Результаты и обсуждение

Согласно проведенным расчетам в раннюю фазу лактации при средней продуктивности коров в 21 кг молока в сутки в их вымени содержалось $3,86 \times 10^{12}$ секреторных клеток (табл. 1). Средняя секреторная активность одной клетки составляла $0,56 \times 10^{-8}$ г молока в сутки. Удой подопытных коров в раннюю фазу лактации варьировали от 10,5 до 25,6 кг молока в сутки. Содержание секреторных клеток в молочной железе животных при этом также значительно менялось: от $1,88 \times 10^{12}$ до $6,08 \times 10^{12}$ шт. Средняя секреторная активность каждой из железистых клеток варьировала, однако, незначительно между животными с разной продуктивностью: от $0,45 \times 10^{-8}$ до $0,68 \times 10^{-8}$ г молока в сутки. Расчет коэффициентов корреляции показал, что в раннюю фазу лактации молочная продуктивность коров высоко и достоверно коррелирует с содержанием железистых клеток в вымени (коэффициент корреляции $r = + 0,72$) и практически не коррелирует с секреторной активностью каждой из клеток (коэффициент корреляции $r = + 0,03$). Подобная закономерность наблюдалась нами ранее у коз (8). Графики регрессионной зависимости величины удоев животных от количества и секреторной активности железистых клеток в вымени также показывают, что в раннюю лактацию молочная продуктивность коров определяется содержанием секреторных клеток в молочной железе (рис. 1а, б). В этот период зависимость удоев коров от количества и секреторной активности клеток в молочной железе может быть описана следующими уравнениями регрессии: $y = 10,5 + 2,83 \times 10^{-12}x_1$ и $y = 20,32 + 1,3 \times 10^8x_2$, где y – суточный удой животного в кг, x_1 – количество секреторных клеток в



вымени в шт., x_2 – секреторная активность одной клетки в г молока в сутки. Из второго уравнения следует, что связь удоев с секреторной активностью клеток является очень слабой. Полученные результаты позволяют заключить, что в раннюю фазу лактации из двух исследуемых в работе факторов молочная продуктивность коров определяется количеством железистых клеток в вымени и не зависит от реально наблюдаемых вариаций секреторной активности клеток.

В фазу поздней лактации при среднем удое коров в 6,8 кг молока в сутки в их молочной железе содержалось $1,66 \times 10^{12}$ секреторных клеток со средней секреторной активностью в $0,41 \times 10^{-8}$ г молока в сутки на клетку (табл. 1). На этой стадии лактации молочная продуктив

Рис. 1. Зависимость удоев коров от количества (а, в) и секреторной активности (б, г) клеток в молочной железе в раннюю (а, б) и позднюю (в, г) фазы лактации

Таблица 1. Содержание и секреторная активность клеток в молочной железе коров в начале и в конце лактации

Показатель	Начало лактации (2-4 мес., n = 12)	Конец лактации (7-8 мес., n = 7)
Удой кг/сут	$21,0 \pm 1,26$	$6,8 \pm 0,47$

Содержание секреторных клеток в железе, шт. $\times 10^{12}$	$3,86 \pm 0,32$	$1,66 \pm 0,12$
Секреторная активность клетки, г молока на клетку в сутки $\times 10^{-8}$	$0,56 \pm 0,025$	$0,41 \pm 0,026$

ность животных зависела от обоих исследуемых факторов (рис. 1в, г). Коэффициенты корреляции удоев коров с количеством железистых клеток в вымени и с их секреторной активностью были соответственно равны $+ 0,86$ и $+ 0,72$. Уравнения регрессионной зависимости удоев коров в конце лактации от содержания и секреторной активности железистых клеток в вымени имели следующий вид: $y = - 0,01 + 4,11 \times 10^{-12}x_1$ и $y = 3,16 + 8,86 \times 10^8x_2$, где y – удой животного в кг, x_1 – содержание секреторных клеток в железе в шт., x_2 – молокосекреторная активность клеток в г молока в сутки. Таким образом, в конце лактации удои коров определяются как содержанием секреторных клеток в вымени, так и их биосинтетической активностью.

Для исследования динамики изменений в ходе лактации секреторной активности клеток молочной железы в работе определяли соотношение концентраций РНК и ДНК в образцах ткани железы, полученных методом биопсии на разных стадиях лактационного цикла от одних и тех же животных (4-х коров и 4-х коз, табл. 2). Величина индекса РНК/ДНК характеризует, как известно, метаболическую активность клеток. Было показано, что первое снижение отношения концентрации РНК к концентрации ДНК в ткани железы как у коров, так и у коз происходит при переходе от пика лактации к фазе средней лактации и в дальнейшем до окончания лактации существенно не изменяется. Второе и очень значительное снижение величины указанного показателя происходит с началом сухостойного периода. Величина индекса РНК/ДНК была у коз несколько выше, чем у коров, что, по-видимому, отражает различие этих видов животных по метаболической активности клеток молочной железы. Таким образом, у коров и коз метаболическая активность клеток молочной железы снижается после прохождения пика лактации и далее в ходе средней и поздней лактации существенно не изменяется.

Таблица 2. Соотношение концентраций РНК и ДНК в ткани молочной железы в ходе лактации коров и коз

Вид животных	Срок лактации, мес.	Удой, кг/сут	Отношение РНК/ДНК
Коровы, n = 4	3-4	$11,7 \pm 1,96$	$2,89 \pm 0,38$
	5-8	$6,7 \pm 1,27$	$2,01 \pm 0,25$
	11-12	$3,6 \pm 1,16$	$2,27 \pm 0,15$
	сухостой, 1 мес.	–	$0,89 \pm 0,58$

Козы, n = 4	1	1,26 ± 0,25	3,25 ± 0,36
	2	1,06 ± 0,27	2,64 ± 0,25
	5	0,81 ± 0,11	2,82 ± 0,35
	7	0,54 ± 0,12	2,61 ± 0,31
	сухостой, 1,5 мес.	–	0,80 ± 0,23

Согласно полученным результатам удой коров в раннюю фазу лактации определяются количеством железистых клеток в вымени животных и не коррелируют с секреторной активностью каждой из клеток. Отсутствие связи молочной продуктивности животных с функциональной активностью железистых клеток вымени на первый взгляд представляется парадоксальным. Это обстоятельство можно объяснить следующим образом. В начальную фазу лактации животные находятся в состоянии выраженной лактационной доминанты, когда идет мобилизация резервов тела, и биосинтез молока наиболее полно обеспечивается энергией и субстратами. В этих условиях секреторная активность каждой из железистых клеток близка к максимально возможной величине и мало варьирует между разными животными. В силу этого в раннюю фазу лактации молочная продуктивность коров в естественных условиях слабо зависит от секреторной активности каждой из клеток железы, а определяется их общим количеством. Такое предположение согласуется с полученными нами результатами, а также данными других авторов о близости в раннюю фазу лактации величин секреторной активности паренхимы молочной железы разных животных (1).

По мере протекания лактации лактационная доминанта несколько снижается, изменяется гормональный статус животного, истощаются резервы тела, что приводит к прекращению поставки эндогенных субстратов для биосинтеза компонентов молока. Биосинтез молока начинает обеспечиваться исключительно за счет кормления животного. В силу этого доступность субстратов для биосинтеза компонентов молока снижается, что в свою очередь приводит к снижению секреторной активности клеток молочной железы. Согласно полученным нами результатам такое снижение секреторной активности клеток молочной железы у коров и коз происходит вскоре после прохождения пика лактации. Снижение секреторной активности клеток молочной железы, по-видимому, находится в обратной зависимости от способности организма животного превращать корма в субстраты для биосинтеза компонентов молока и у разных животных выражено в разной степени. В связи с этим после фазы ранней лактации секреторная активность клеток молочной железы становится фактором, влияющим на молочную продуктивность животного.

Согласно полученным в работе результатам в ходе средней и поздней лактации секреторная активность клеток молочной железы ко-

ров и коз существенно не изменяется. В работе Вилда и соавт. (3) также не наблюдалось в ходе средней лактации изменений метаболической активности секреторных клеток молочной железы коз. Исходя из этих данных можно заключить, что снижение продукции молока животными в середине и в конце лактации обусловлено главным образом потерей секреторных клеток из молочной железы.

В целом зависимость удоев коров от количества и функциональной активности секреторных клеток в молочной железе можно представить в следующем виде. В раннюю лактацию молочная продуктивность животных определяется количеством железистых клеток в вымени, а секреторная активность каждой из клеток максимальна и заметно не различается у разных животных. После прохождения пика лактации секреторная активность клеток молочной железы снижается у отдельных животных в разной степени и становится фактором, влияющим на молочную продуктивность. В ходе средней и поздней лактации снижение удоев обусловлено главным образом элиминированием секреторных клеток из вымени, а уровень молочной продуктивности зависит как от количества клеток в молочной железе, так и от их функциональной активности.

Представленные результаты еще раз подтверждают, что стратегия повышения молочной продуктивности коров должна быть направлена на создание условий для максимального развития молочной железы в ходе беременности животных, на обеспечение полноценного их питания для предотвращения снижения секреторной активности железистых клеток вымени и на поиск способов замедления гибели этих клеток в ходе лактации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davis S.R., Hughson G.A., Bryant A.M. Differences in the extent of mammary development between Jersey cows of high or low genetic merit. *Proc. Soc. Anim. Prod.*, 1983, 43: 71-72.
2. Linzell J.L. Measurement of udder volume in live goats as an index of growth and function. *J. Dairy Sci.*, 1966, 49, 3: 307-311.
3. Wilde C.J., Henderson A.J., Knight C.H. Metabolic adaptations in goat mammary tissue during pregnancy and lactation. *J. Reprod. Fert.*, 1986, 76: 289-298.
4. Anderson R.R. Mammary gland. *Lactation*, 1985: 3-38.
5. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974: 724 с.
6. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышэйшая школа, 1973: 107-168.
7. Георгиев Г.П. Методы определения, выделения и фракционирования нуклеиновых кислот. В кн.: Химия и биохимия нуклеиновых кислот. М.: Медицина, 1968: 76-78.

8. Сапунов М.И., Медведев И.К. Зависимость секреции молока от количества и функциональной активности клеток молочной железы у коз. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных, Боровск, 1989, 2: 47-50.

ВЛИЯНИЕ ЛАКТОГЕННЫХ И ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ ГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ КОМПОНЕНТОВ ПЛАЗМИНОВОЙ СИСТЕМЫ В МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КОРОВ

М.И. Сапунов, Е.В. Андрейчук, К.И. Плишкина, З.Н. Макара, А.С. Мартынова, А.В. Кожаскина, И.К. Медведев
Лаборатория биохимии лактации

Введение лактирующим коровам препарата соматотропного гормона вызывает снижение активности плазмينا в молоке животных. Эффект соматотропного гормона на активность плазмينا в молоке является опосредованным, поскольку этот гормон не влияет на активности активатора плазминогена и ингибитора плазминовой системы в эксплантатах молочной железы при их культивировании in vitro. Пролактин также не оказывает действия на активность этих компонентов плазминовой системы в культуре ткани молочной железы. Гидрокортизон снижает активность активатора плазминогена и обеспечивает сохранение высокой активности ингибитора плазминовой системы при культивировании эксплантатов молочной железы коров. Предполагается, что соматотропный гормон и гидрокортизон, подавляя активность плазминовой системы в молочной железе, участвует в механизмах сохранения в ней целостности альвеолярных структур.

Введение

По современным представлениям протеолитический фермент-плазмин в организме животных выполняет не только фибринолитическую функцию, но может также расщеплять межклеточные белки, вызывая в тканях нарушение связей клеток друг с другом (1). Предполагается, что посредством этого механизма плазмин участвует в процессах затухания лактации и инволюции молочной железы (2).

Молоко животных содержит все основные компоненты плазминовой системы: плазмин, его предшественник – плазминоген, активаторы плазминогена, ингибиторы плазминовой активности (3, 4). Активность компонентов плазминовой системы в молочной железе изменяется в зависимости от ее функционального состояния. Активность плазмина и плазминогена в молоке повышается по мере затухания лак-

тации и при мастите (2, 5). Синтез активатора плазминогена в ткани молочной железы грызунов возрастает в период инволюции железы и в случае ее малигнизации (6). Механизмы регуляции активности компонентов плазминовой системы в молочной железе изучены недостаточно. Они могут включать регуляцию транспорта в молоке из крови плазминогена и содержащих его активаторы соматических клеток, аутокринную и гормональную регуляцию синтеза активатора плазминогена в ткани молочной железы (2, 6). Показано, что у грызунов гидрокортизон, пролактин и окситоцин препятствуют накоплению *in vivo* в ткани молочной железы активатора плазминогена при индуцировании инволюции железы (6). В перевиваемой культуре клеток молочной железы человека глюкокортикоиды подавляют синтез активатора плазминогена урокиназного типа, повышают синтез активатора плазминогена тканевого типа и не влияют на синтез ингибиторов этих активаторов (7). В культуре ткани молочной железы грызунов и в перевиваемой культуре клеток молочной железы коров синтез активатора плазминогена стимулируется инсулином и подавляется глюкокортикоидными гормонами (6, 8).

В научной литературе имеется мало сведений о гормональной регуляции активности компонентов плазминовой системы в молочной железе жвачных животных. Исследование данного вопроса представляет интерес как для выявления возможных особенностей регуляции активности плазминовой системы у этих видов животных, так и для разработки способов гормонального воздействия на ее компоненты. Целью работы явилось изучение влияния лактогенных гормонов на активность компонентов плазминовой системы в молоке и в ткани молочной железы коров.

Методы исследований

В первом опыте изучали влияние инъекций соматотропного гормона на активность плазмينا в молоке коров. Было сформировано две группы животных, по 4 головы в каждой группе, находящихся на 3 – 5-м месяцах лактации. Животным опытной группы три раза с интервалом в две недели вводили подкожно по 500 мг препарата соматотропного гормона; животным контрольной группы вводили физиологический раствор. До начала инъекций гормона, а также на 6-е и 14-е сутки после последней инъекции определяли активность плазмينا в молоке коров и концентрацию соматотропного гормона в крови и в молоке животных. При проведении анализов концентрацию соматотропного гормона определяли иммуноферментным методом (9), а активность плазмина – казеинолитическим методом (10).

Во второй серии опытов исследовали влияние лактогенных гормонов на активности активатора плазминогена и ингибитора плазминовой системы в культуре ткани молочной железы коров. Было проведено 5 независимых экспериментов. Ткань молочной железы животных получали методом биопсии. Ее отмывали в среде 199 от остатков секрета и крови и нарезали ножницами на мелкие кусочки – эксплантаты – объемом 1-2 мм³. Эксплантаты молочной железы культивировали при 37° С в течение 48 ч в среде 199, содержащей лактогенные гормоны и их комбинации. Изучали влияние следующих гормонов: соматотропного гормона, пролактина, гидрокортизона, пролактина совместно с гидрокортизоном или соматотропным гормоном. Гидрокортизон применяли в концентрации 1 мкг/мл, а белковые гормоны – в концентрации 5 мкг/мл. В качестве контроля использовали эксплантаты железы, прокультивированные в питательной среде без гормонов, а также ткань молочной железы без культивирования, которую сохраняли до обработки в жидком азоте. Для определения активности активатора плазминогена и ингибитора плазминовой системы эксплантаты железы после их культивирования гомогенизировали в 4-кратном по отношению к весу ткани объеме 0,1 М Трис-НСl буфера, рН 8,1 и из части гомогената получали постмитохондриальный экстракт путем центрифугирования в течение 30 мин при 15000 g. Активность активатора плазминогена определяли в гомогенатах ткани по площади зоны лизиса фибрина на фибриновых пластинах, используя пластины с неинактивированным и инактивированным тепловой обработкой плазминогеном, и выражали в мм² в сутки (2). Активность ингибитора плазминовой системы определяли в постмитохондриальных экстрактах также методом фибриновых пластин, как разность активностей вызываемого урокиназой лизиса фибрина при добавлении к ней в одном случае 0,1 М Трис-НСl-буфера, а в другом постмитохондриального экстракта ткани эксплантатов железы.

Результаты и обсуждение

В задачи первой части работы входило изучить возможную регуляцию соматотропным гормоном активности плазминовой системы молочной железы коров *in vivo*. Для этого животным инъецировали препарат соматотропного гормона и определяли активность плазмينا в молоке. Полученные результаты представлены в табл. 1. В предварительный период опыта животные контрольной и опытной групп существенно не различались по концентрации в плазме крови соматотропного гормона и по активности плазмينا в молоке. В результате трехкратных инъекций препарата гормона его концентрация в плазме крови коров опытной группы повысилась более чем в 3 раза по сравнению с

контрольными животными. Это сопровождалось существенным изменением активности плазмина в молоке коров опытной группы. На 6-е сутки после последней инъекции соматотропного гормона активность плазмина в молоке была снижена у этих животных почти в 2 раза. При этом наблюдалась тенденция к повышению удоев коров опытной группы по сравнению с контрольной. Концентрация соматотропного гормона в молоке подопытных коров в результате инъекций этого гормона животным не изменялась. На 14-е сутки после последней инъекции гормона активность плазмина в молоке коров опытной группы оставалась еще пониженной, хотя к этому времени животные опытной и контрольной групп уже не различались по концентрации соматотропного гормона в плазме крови. Это, по-видимому, отражает некоторую инерционность механизмов регуляции активности плазминовой системы молочной железы. Таким образом, в проведенных опытах искусственное повышение концентрации соматотропного гормона в плазме крови коров привело к снижению активности плазмина в молоке животных.

Таблица 1. Влияние инъекций экзогенного гормона роста на молочную продуктивность, активность плазмина в молоке и концентрацию этого гормона в крови и молоке подопытных коров ($M \pm m$, $n = 4$)

Период опыта	Показатель	Контрольная группа	Опытная группа
Предварительный	Удой, кг	14,1 ± 1,7	16,7 ± 0,4
	Активность плазмина, мкг тирозина/мл	11,5 ± 3,0	11,6 ± 7,0
	Концентрация гормона роста, (нг/мл):		
	в плазме крови	6,2 ± 2,0	3,9 ± 0,5
6 сут после инъекций гормона	Удой, кг	12,5 ± 0,6	16,1 ± 0,4
	Активность плазмина, мкг тирозина/мл	11,9 ± 2,3	6,1 ± 0,4
	Концентрация гормона роста, (нг/мл):		
	в плазме крови	8,1 ± 2,1	24,7 ± 5,2
14 сут после инъекций гормона	Удой, кг	14,5 ± 0,8	16,3 ± 0,3
	Активность плазмина, мкг тирозина/мл	10,3 ± 2,3	6,2 ± 0,5
	Концентрация гормона роста, (нг/мл):		
	в плазме крови	7,6 ± 0,9	6,9 ± 2,6
	в молоке	2,3 ± 0,6	2,5 ± 0,2

В научных публикациях нет единого мнения об эффекте соматотропного гормона на активность плазминовой системы молочной железы: в одних случаях он наблюдается (12), в других – нет (13). Причины этого не ясны. Полученные нами результаты согласуются с данными опытов Политиса и соавт. (12), в которых также наблюдалось снижение активности плазмина в молоке коров вследствие инъектирования животным соматотропного гормона. Механизм такого действия гормона

пока неизвестен. Отмеченное в наших опытах отсутствие изменений концентрации этого гормона в молоке коров опытной группы косвенно указывает на то, что соматотропный гормон непосредственно не влияет на молочную железу. Политис и соавт. (12) предположили, что механизм подавляющего действия соматотропного гормона на плазминовую систему молочной железы включает повышение концентрации в плазме крови подопытных животных инсулиноподобного фактора роста-1 и замещение им в гормонорецепторных комплексах молочной железы инсулина, который оказывает стимулирующее влияние на активность плазминовой системы.

Можно предположить и другой механизм влияния соматотропного гормона на плазминовую систему молочной железы. Возможно, что этот гормон, повышая опосредованным путем метаболическую активность клеток молочной железы, приводит к усилению прочности межклеточных связей. В результате этого снижается поступление в молоко из крови плазминогена и содержащих его активаторы соматических клеток, что обуславливает снижение активности плазмина в молоке.

Результаты наших экспериментов и опытов Политиса и соавт. (12) позволяют предположить, что известное стимулирующее действие соматотропного гормона на молочную продуктивность жвачных животных частично может быть связано с влиянием этого гормона на активность плазмина в молочной железе. Согласно гипотезе Политиса и соавт. (2) плазмин участвует в механизмах элиминирования секреторных клеток из молочной железы. В случае правильности этого предположения изменение концентрации соматотропного гормона в крови животных может посредством изменения активности плазмина в молочной железе влиять на сохранность в ней популяции секреторных клеток и отсюда на молочную продуктивность. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о торможении под действием соматотропного гормона потери секреторных клеток из молочной железы в ходе лактации коз (14).

Известно, что в ходе лактации происходит снижение концентрации соматотропного гормона в крови коров (15) и повышение активности плазмина в их молоке (2). Возможно, что наблюдающееся во второй фазе лактации снижение удоев животных частично связано с уменьшением в этот период ингибирующего влияния соматотропного гормона на активность плазмина в молочной железе и, как следствие, с усилением элиминирования секреторных клеток из вымени.

Во второй серии опытов изучали влияние гидрокортизона, пролактина, соматотропного гормона, а также комбинаций пролактина с гидрокортизоном или соматотропным гормоном на активности активатора плазминогена и ингибитора плазминовой системы при культивировании эксплантатов в ткани молочной железы коров. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Было установлено, что в присутствии в культуральной среде гидрокортизона или гидрокортизона совместно с пролактином происходит значительное снижение активности активатора плазминогена в ткани эксплантатов молочной железы как по сравнению с тканью эксплантатов, прокультивированных в питательной среде без гормонов, так и по сравнению с исходной тканью железы. При культивировании ткани железы в питательной среде не содержащей гормонов (в контрольных образцах) происходило значительное повышение в эксплантатах активности этого компонента плазминовой системы. Пролактин и соматотропный гормон, примененные по отдельности или совместно, не оказывали достоверного эффекта на такое изменение активности активатора плазминогена; наблюдалась лишь тенденция к снижению его активности в присутствии соматотропного гормона и к повышению активности в присутствии пролактина по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние гормонов на активности активатора плазминогена и ингибитора плазминовой системы в культуре ткани молочной железы ($M \pm m$, $n=5$)

Объект исследования	Активность активатора плазминогена, мм ² /сут	Активность ингибитора плазминовой системы, мм ² /сут
Исходная ткань железы	26,8 ± 7,0	94,7 ± 9,6
Ткань железы после культивирования в отсутствие гормонов (контроль)	63,8 ± 7,8	36,7 ± 11,4
Ткань железы после культивирования в присутствии гормонов:		
гидрокортизона	6,9 ± 3,0	85,8 ± 17,1
пролактина	72,4 ± 7,5	21,9 ± 11,7
соматотропного гормона	46,0 ± 13,5	40,5 ± 13,7
гидрокортизона + пролактина	10,4 ± 2,7	96,6 ± 1,7
пролактина + сомат. гормона	51,2 ± 13,1	40,2 ± 25,6

При определении активности ингибитора плазминовой системы было установлено, что гидрокортизон, примененный в отдельности или совместно с пролактином сохранял активность этого компонента системы в эксплантатах железы после их культивирования на таком же уровне, как в исходной ткани. Культивирование эксплантатов в питательной среде не содержащей гормонов (контроль) приводило к снижению активности ингибитора по сравнению с его активностью в исходной ткани. Активность ингибитора плазминовой системы в эксплантатах ткани молочной железы, прокультивированных в присутствии пролактина и соматотропина, существенно не отличалась от активности этого компонента плазминовой системы в контрольных эксплантатах,

прокультивированных в питательной среде не содержащей гормонов (табл. 2).

Таким образом, гидрокортизон снижает активность активатора плазминогена и обеспечивает сохранность активности ингибитора плазминовой системы в культуре ткани молочной железы коров. Пролактин и соматотропный гормон существенно не влияют на активности этих компонентов плазминовой системы в культивируемой ткани молочной железы.

Полученные результаты согласуются с данными опытов Озовски и соавт. (6), где гидрокортизон подавлял активность активатора плазминогена в эксплантатах молочной железы мышей, а пролактин не оказывал на нее влияния. В опытах Буссо и соавт. (7) было показано, что дексаметазон снижает уровень синтеза матричных РНК активатора плазминогена урокиназного типа в культуре клеток молочной железы человека. По-видимому, по такому же механизму гидрокортизон подавлял и в наших опытах активность активатора плазминогена в молочной железе коров.

Кроме секреторных клеток молочной железы глюкокортикоидные гормоны подавляют активность активатора плазминогена в фибробластах и в опухолевых клетках (1). По всей видимости, ингибирование активности плазминовой системы является одним из общих механизмов действия глюкокортикоидных гормонов на клетки и ткани. Зетл и соавт. (16) показали, что глюкокортикоидный гормон дексаметазон *in vitro* обеспечивает образование прочных связей между клетками молочной железы мышей. Возможно, что одним из механизмов такого действия дексаметазона может являться ингибирование им активности компонентов плазминовой системы клеток и защита в результате этого межклеточных белков от разрушения.

По-видимому, глюкокортикоидные гормоны через подавление активности плазминовой системы участвуют также *in vivo* в сохранении альвеолярных структур в ткани молочной железы. Показано, в частности, что у грызунов инъекции этих гормонов задерживают инволюцию молочной железы и стимулируют секрецию молока (6, 17). Введение коровам глюкокортикоидных гормонов, однако, или не влияет на уровень секреции молока, или дает отрицательный эффект (17). У этого вида животных секреция глюкокортикоидов, вероятно, не является в нормальных условиях фактором, лимитирующим синтез компонентов молока. Возможно, что у коров регуляторное влияние глюкокортикоидных гормонов на сохранение клеточных структур в молочной железе определяется уровнем рецепции этих гормонов секреторными клетками.

Представленные результаты показывают, что помимо известных эффектов соматотропного гормона на обеспечение молочной желе-

зы субстратами и на скорость кровотока в ней, механизмы галактопоэтического действия этого гормона у жвачных животных могут включать ингибирующее его влияние на активность плазмина в молочной железе, посредством чего достигается повышение сохранности в ней секреторных клеток.

Подобно грызунам, в молочной железе жвачных животных глюкокортикоидные гормоны являются главным гормональным ингибитором плазминовой системы и через этот механизм стабилизируют клеточную структуру молочной железы. В практике молочного животноводства иногда возникает необходимость ускорить инволюцию этого органа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что один из подходов решения этой задачи может включать искусственное снижение рецепции глюкокортикоидных гормонов в молочной железе.

Выводы

1. Соматотропный гормон при инъекции коровам снижает опосредованным путем активность плазмина в молоке животных.
2. Пролактин и соматотропный гормон не оказывают непосредственного влияния на активности активатора плазминогена и ингибитора плазминовой системы в культуре ткани молочной железы коров.
3. Гидрокортизон подавляет активность плазминовой системы в культуре ткани молочной железы коров, снижая в ней активность активатора плазминогена и сохраняя активность ингибитора плазминовой системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Saksela O., Rifkin D.B. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annual review of cell biology*, 1988, 4: 93-126.
2. Politis I., Lachance E., Blook E. Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution. *J. Dairy Sci.*, 1989, 72, 4: 900-906.
3. Korycka-Dahl M., Ribadeau D.B., Chene N., Martal J. Plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.*, 1983, 66, 4:704-711.
4. Politis I., White J. H., O'Hare K., Zavizion B., Gilmore J., Caler W. Distribution of plasminogen activator forms in fractions of goat milk. *J. Dairy Sci.*, 1994, 77, 10: 2900-2906.
5. Schaar J., Funke H. Effect of subclinical mastitis on milk plasminogen and plasmin compared with that on sodium, antitrypsin and N-acetyl- β -D-glucosaminidase. *J. Dairy Res.*, 1986, 53: 515-528.
6. Ossowski L., Biegel D., Reich E. Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell*, 1979, 16, 4: 929-940.

7. Busso N., Belin D., Faily-Crepin C., Vassalli J.-D. Plasminogen activators and their inhibitors in human mammary cell line (HBL-100), J. Biol. Chem., 1986, 261, 20: 9309-9315.
8. Politis I., White J.H., Zavizion B. Hormonal regulation of plasminogen activator produced by bovine mammary epithelial cells. J. Dairy Sci., 1994, 77 (suppl. 1):227.
9. Радченков В.П., Бутров Е.В., Матвеев В. А., Сухих В.Ф., Голенкевич Е.К., Панасенко В.П., Пономарева М.Ф., Сапунова Е.Г. Определение гормонов в крови молодняка крупного рогатого скота и его гормональный статус. Методические указания, Боровск, 1980: 24-28
10. Juffs H.S. Proteolysis detection in milk. J. Dairy Res., 1973, 40, 3: 371-381.
11. Андреевко Г.В., кн.: Методы исследования фибринолитической системы крови, 1981: 43-45.
12. Politis I., Block E., Turner J. D. Effect of somatotropin on the plasminogen and plasmin system in the mammary gland: proposed mechanism of action for somatotropin on the mammary gland. J. Dairy Sci., 1990, 73, 6: 1494-1499.
13. Binelli M. Vanderkooi W.K., Chapin L.T., Vandehaar M. J., Turner J.D., Moseley W.M., Tucker H.A. Comparison of growth hormone-releasing factor and somatotropin: body growth and lactation of primiparous cows. J. Dairy Sci., 1995, 78, 10: 129-2139.
14. Knight C.H., Fowler P.A., Wilde C.J. Galactopoietic and mammogenic effects of long term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. J. of endocrinology, 1990, 127: 129-138.
15. Радченков В.П., Бутров Е.В., Панасенко В.Н., Сапунова Е.Г., Сухих В.Ф., Исмаилов С.А., Григорьев В.В. Гормональный профиль, рост и продуктивность телок, нетелей и коров. Сб. научных трудов ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных, 1988, 35: 34-46.
16. Zettl K.S., Staastad M.D., Riskin P., Parry G., Machen T.E. Firestone G.L. Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cells in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 9069-9073.
17. Тверской Г.Б. Регуляция секреции молока. Л.: Наука, 1972: 26-27.

**ПОРОДНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА
МОЛОЧНОГО ЖИРА У ХОЛМОГОРСКИХ И ЧЕРНО-ПЕСТРЫХ
КОРОВ И ИХ ПОМЕСЕЙ С ГОЛШТИНАМИ**

П.В. Матющенко, А.И. Мурашов
Лаборатория биохимии и физиологии лактации

Исследовали жирнокислотный состав молочного жира у холмогорских и черно-пестрых коров и их помесей с голштинами. Необходимыми условиями проведения исследования были: стадия лактации, возраст, происхождение, продуктивность, проверка на мастит, сбалансированное кормление. Холмогорские коровы пре-

восходили черно-пестрых, а помеси – исходные породы по уровню молочной продуктивности и проценту жира в молоке. В жирнокислотном составе молочного жира достоверные различия между холмогорами и черно-пестрыми имели место по одиннадцати кислотам. Суммарно $C_4 - C_{14}$ жирных кислот оказалось больше в молочном жире холмогорских коров, что свидетельствует о большем развитии у них функции синтеза в молочной железе жирных кислот. Наблюдаемое повышение жирномолочности при скрещивании испытуемых пород с голштинами происходит в основном за счет усиления жирсинтезирующей, а не поглотительной функции молочной железы.

Введение

Перспективы развития животноводства требуют продолжения, а в ряде случаев и более глубокого изучения как в целом продуктивных качеств животных, так и некоторых менее традиционных показателей. Выход и качество получаемых из молока продуктов определяются целым рядом технологических и зоотехнических факторов, одним из которых является породная принадлежность животных. Породные особенности животных сказываются не только на количественном содержании тех или иных компонентов молока (2, 6), но и на их составе и структуре (биохимическом полиморфизме). Для жира, по содержанию которого до сих пор оценивается отечественное молоко (1), индикатором качества является его жирнокислотный состав. Имеющиеся данные о его значительном влиянии на технологические качества молочных продуктов (7), их диетические свойства, оказывающие (как показали систематические исследования в ряде зарубежных стран) непосредственное влияние на состояние здоровья человека в связи с проблемой развития и предупреждения риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний (8), подтверждают обоснованность интереса к этому показателю.

По изменчивости состава молочного жира имеется значительное количество данных, полученных на коровах зарубежных пород. Их анализ показывает, что основными источниками вариаций жирнокислотного состава являются стадия лактации, кормление (чаще связанное с сезоном года) (3) и генотип животного (5). Коэффициент наследуемости жирнокислотного профиля молочного жира по этим данным находится в пределах от 0,1 до 0,3, т.е. до одной трети вариаций может быть обусловлено наследственностью животного. Следовательно, при серьезном подходе к вопросам формирования молочного стада, нельзя оставлять без внимания вопрос генетической обусловленности компонентного состава молока. Однако наши отечественные породы

молочного скота по этому признаку в должной степени или вовсе не изучены.

Материалы и методы

В 1997-1998 гг. нами начато исследование жирнокислотного состава молочного жира у отечественных пород молочного скота на примере холмогорских и черно-пестрых коров и их помесей с голштинами в племязаводе «Ворсино» и ОПХ «Ермолино».

Необходимыми условиями методики проводимых исследований были следующие требования: стадия лактации (2-6 месяцев); возраст (2-5 лактации); происхождение (генотип по быку); продуктивность (фенотип-удой за лактацию и суточный удой на момент взятия проб); проверка образцов молока на мастит (по количеству соматических клеток). Исследовали по 10 животных в каждой чистопородной и помесной группе с двукратной повторностью. Наиболее критическим в условиях проведения исследований был фактор кормления. Животные получали сходные по структуре рационы, включающие сено, силос, зерновую смесь, патоку, минеральные подкормки. В летнее время животные кормились на пастбище с подкормками (в период раздоя) зеленой массой и концентратами (150-250 г/кг молока).

Результаты и обсуждение

В нашем случае холмогорские коровы превышали черно-пестрых, а помеси – животных исходных пород по уровню молочной продуктивности и проценту жира в молоке. Превышение по жирности молока было менее выраженным (табл. 1).

Таблица 1. *Продуктивность подопытных коров*

Порода	Холмогорская	Черно-пестрая	Холмогорская х голштина	Черно-пестрая х голштина
Удой за предыдущую лактацию, кг	3961	3360	4152	3442
Жирность молока за предыдущую лактацию, %	3,55	3,51	3,94	3,67
Удой в момент взятия пробы, кг	19,6	17,7	20,3	18,7
Жирность молока в момент взятия пробы, %	3,19	3,16	3,35	3,26

В жирнокислотном составе молочного жира достоверные различия ($p < 0,05$) между холмогорскими и черно-пестрыми коровами имели место по одиннадцати кислотам, причем по шести жирным кислотам с пока-

зателем достоверности меньше 0,001 (табл. 2). Интерес представляет группа низко- и среднемолекулярных кислот от C₄ до C₁₄, которая, как известно, синтезируется в клетках молочной железы. Суммарно этих кислот оказалось больше в молочном жире холмогорских коров. В свое время в институте на материале сравнительного и межвидового изучения жирномолочности жвачных, было предложено рассматривать эту группу жирных кислот показателем степени развития жирсинтезирующей функции молочной железы. Как правило у более жирномолочных коров больше развита функция синтеза кислот при относительно меньшей, чем у жидкомолочных степени поглощения железой готовых кислот. Однако в полученных нами данных наблюдается только тенденция к положительной связи между жирностью молока и пропорцией синтезируемых в железе кислот. Но с продукцией молочного жира доля синтезируемых кислот у холмогоров, вследствие более высокой у них продуктивности, коррелировала достоверно.

Таблица 2. Жирнокислотный состав молочного жира у холмогорских и черно-пестрых коров

Жирная кислота	Холмогорская порода		Черно-пестрая		P
	М	± m	М	± m	
C ₈	0,84	0,014	0,92	0,094	0,5
C ₁₀	2,60	0,068	2,36	0,015	0,2
C ₁₁	0,89	0,068	0,48	0,020	0,001
C ₁₂	3,71	0,012	3,29	0,019	0,1
C _{12:1}	1,28	0,019	0,45	0,029	0,001
C ₁₃	0,67	0,104	0,19	0,018	0,001
C ₁₄	10,37	0,308	8,96	0,953	0,2
C ₁₅	2,49	0,112	3,15	0,414	0,2
C _{15:1}	1,77	0,114	1,80	0,101	0,05
C ₁₆	19,27	1,455	14,72	0,490	0,01
C _{16:1}	3,89	0,842	6,36	0,379	0,02
C ₁₇	1,99	0,205	3,96	0,284	0,001
C _{17:1}	1,79	0,247	1,21	0,058	0,05
C ₁₈	12,22	0,545	11,12	0,445	0,2
C _{18:1}	24,65	0,831	31,50	0,559	0,001
C _{18:2}	3,79	0,254	2,78	0,113	0,01
C _{18:3}	2,69	0,171	1,64	0,069	0,001
Сумма C ₆ + ½ C ₁₆	36,20	0,681	32,14	0,595	0,001
100% – сумма					
C ₆ + ... ½ C ₁₆	63,80	0,824	67,86	0,913	0,01
Сумма C ₁₈ ненас.	31,13	0,486	35,92	0,691	0,001
Сумма C ₁₈ всех	43,35	0,695	47,04	0,793	0,01

Исследования последних лет показали выражено неодинаковое влияние отдельных кислот молочного жира на липидный, в частности, на холестеринный метаболизм у животных и человека. Неблаго-

приятный эффект – повышение уровня холестерина в крови – оказывают C_{12} , C_{14} и C_{16} кислоты (4). Неожиданным оказалось отсутствие вредного влияния у насыщенной C_{18} – стеариновой кислоты. Большая пропорция неблагоприятных для здоровья кислот и меньшая доля незаменимых ненасыщенных C_{18} кислот имела место в молочном жире холмогорских коров и их помесей с голштинами по сравнению с чистопородными черно-пестрыми и помесными коровами.

Таблица 3. **Жирнокислотный состав молочного жира у помесей холмогорских и черно-пестрых коров с голштинами**

Жирная кислота	Холмогорские помеси		Черно-пестр. помеси		Р
	М	± m	М	± m	
1	2	3	4	5	6
C_4	0,03	0,006	0,02	0,00	0,2
C_6	0,17	0,05	0,14	0,01	0,5
C_8	0,22	0,03	0,21	0,02	0,5

продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6
C_9	0,006	0,001	0,002	0,001	0,5
C_{10}	0,92	0,23	0,65	0,12	0,2
C_{12}	1,82	0,23	1,21	0,14	0,1
C_{11}	0,09	0,01	0,07	0,01	0,2
$C_{12:1}$	0,12	0,02	0,08	0,01	0,5
C_{13}	0,07	0,02	0,07	0,01	0,5
C_{14}	10,97	1,80	8,17	0,56	0,02
$C_{14:1}$	1,37	0,03	1,41	0,01	0,5
C_{15}	0,32	0,02	0,22	0,03	0,5
$C_{15:1}$	0,22	0,01	0,34	0,02	0,5
C_{16}	44,05	1,19	42,57	1,17	0,05
$C_{16:1}$	1,54	0,04	1,77	0,02	0,5
C_{17}	0,37	0,02	0,31	0,03	0,5
C_{18}	8,41	0,23	9,72	0,94	0,001
$C_{18:1}$	28,65	1,33	33,40	1,35	0,05
$C_{18:2}$	0,51	0,01	0,56	0,03	0,1
C_{20}	0,05	0,007	0,06	0,003	0,5
$C_{18:3}$	0,25	0,02	0,32	0,03	0,5
$C_{20:2}$	0,05	0,005	0,07	0,001	0,5
$C_{20:4}$	0,04	0,001	0,06	0,002	0,5
C_{22}	0,03	0,002	0,03	0,001	0,5
Сумма от C_4 до $\frac{1}{2}$	38,12	1,05	33,55	1,29	0,01
Сумма C_{18} ненас.	29,41	1,51	34,28	1,33	0,05
Сумма C_{18} всех	37,82	1,23	44,00	1,84	0,01

При скрещивании с быками голштинской породы у тех и у других помесей наблюдалось заметное повышение жира в молоке и тенденция к увеличению в молочном жире коротко- и среднецепочных жирных кислот (табл. 3).

Выводы

1. Холмогорские и черно-пестрые коровы при одинаковом качественном составе жирных кислот молочного жира различаются по их количественному содержанию. Более выраженную у холмогоров и их помесей функцию синтеза жирных кислот сопровождает повышение в молочном жире содержания неблагоприятных для здоровья C_{12} , C_{14} и C_{16} кислот.

2. Анализ жирнокислотного профиля молочного жира помесных с голштинами животных показывает, что повышение жирномолочности при скрещивании происходит за счет усиления жирсинтезирующей, а не поглотительной функции молочной железы.

3. Породный стандарт на жирнокислотный состав молочного жира необходимо включать в селекционные индексы для использования в практике разведения молочного скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький Н.Г. Производство молока и повышение его качества. М. ВНИИТЭИСХ, 1982.
2. Медведев И.К. Биохимия синтеза жира молока. В кн.: Физиология и биохимия лактации. Л.: Наука, 1986.
3. Овчаренко Э.В. Взаимосвязь между расходом жира тела и жирнокислотным составом жира молока. Тезисы докладов Всесоюзного совещания. Боровск, 1973.
4. Crocker L.M. et al. Influence of Processed Corn Grain in diets of dairy Cows on Digestion of nutrients and milk composition. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81: 2394-2407.
5. Gibson J.P. The Potential for genetic change in milk fat composition. *J. Dairy Sci.*, 1991, 74: 3258.
6. Gresti J., Bugauf M., Maniongi C. Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.*, 1993, 76: 2794.
7. Jensen R.G., Ferris A.M. Lammi-Kube C.J. The Composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 1991, 74: 4576.
8. Khorasani G.R., Kennelly J.J. Effect of added dietary fat on performance, rumen, characteristics, and Plasma Metabolites of midlactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1998, 81: 3478.

ЭСКИЗНАЯ МОДЕЛЬ ОБРАЗОВАНИЯ ОСНОВНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ МОЛОЧНОГО ЖИРА

Д.Е. Панюшкин, А.В. Лысов
Лаборатория межклеточного обмена

На основе экспериментальных и литературных данных создана обобщенная модель образования основных жирных кислот молочного жира. Представленная модель способствует разрешению вопросов возникающих при оценке затрат субстратов на формирование жирнокислотного состава жира молока, а также позволяет количественно рассчитать потоки некоторых метаболитов в молочной железе лактирующих животных. В работе приведены данные поглощения и суточного транспорта высокомолекулярных жирных кислот (ВМЖК), ацетата и β -оксибутирата в вымени коров, полученные на основе измерения артерио-венозной разности и объемной скорости кровотока.

Введение

В последнее время в нашей стране и за рубежом разрабатываются новые подходы к нормированию питания сельскохозяйственных животных, адекватно отвечающего их физиологическим потребностям и позволяющего более полно реализовать потенциал продуктивности. Для понимания путей использования питательных веществ корма в организме животных важное значение могут иметь алгоритмы количественного и качественного преобразования нутриентов на уровне целого организма и отдельных органов, созданные на основе экспериментального материала. Знание закономерностей преобразования субстратов в цепи корм-продукция невозможно без детальной проработки всех промежуточных звеньев этого процесса. У лактирующих коров, наряду с исследованиями потока питательных веществ крови от желудочно-кишечного тракта, печени и других органов, необходимо исследовать поглощение метаболитов в вымени, как органе, обеспечивающем выход основной продукции животного. В данной работе была предпринята попытка определить количественный транспорт и трансформацию высокомолекулярных жирных кислот, ацетата и β -оксимасляной кислоты как предшественников жирных кислот молочного жира, для того чтобы смоделировать закономерности его образования, что в дальнейшем позволит воздействовать на данный процесс с целью регулирования качественных характеристик молока и изменения свойств этого продукта.

Молочный жир состоит в большей мере из триацилглицеролов (97-99%). В нем также присутствуют фосфолипиды (0,6-1%), холестерол

(0,2-0,4%), моно- и диацилглицеролы (0,3-0,4%), а также следы эфиров холестерина, свободных жирных кислот и некоторых других веществ (55, 69, 87). В нем обнаружено около 437 жирных кислот от C_2 до C_{28} . Их можно классифицировать как насыщенные, ненасыщенные (цис и транс), одно- или многоветвленные, циклические и кетокислоты (47, 78). Для молочного жира жвачных вообще, и коров в частности, характерно большое количество миристиновой, пальмитиновой, стеариновой и олеиновой жирных кислот (39, 60). Так в жире молока коров содержится C_4 - C_{12} – 5-10%, C_{16} – 25-30%, C_{18} – 10-15%, $C_{18:1}$ – 20-35% и $C_{18:2}$ - $C_{20:4}$ – 3-8%. В незначительном количестве в молоке присутствуют разветвленные, циклические и кетокислоты – менее 1 %, а также пентаеновые и гексаеновые кислоты 0,06-0,37% (40).

В вымени синтез жира молока может рассматриваться как процесс, состоящий из двух стадий. Первой стадией является формирование фонда жирных кислот и глицерола, второй – включение их в триацилглицеролы молока. Не вызывает сомнения, что жирные кислоты молочного жира, в основном длинноцепочные, происходят из липидов крови, в то время как жирные кислоты с относительно меньшей длиной цепи синтезируются в секреторных клетках вымени (79).

Главным источником высокомолекулярных кислот у жвачных служат триацилглицеролы артериальной крови, переносимые в составе липопротеидных комплексов очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикронов (23, 26, 30, 38, 94). Но содержание хиломикронов в крови у крупного рогатого скота ниже, чем у коз (44), следовательно можно предположить, что у коров основными переносчиками являются ЛПОНП (5, 15).

В процессе поглощения липопротеидов молочной железой принимает участие липопротеиновая липаза (81) – фермент, катализирующий гидролиз липопротеидных триацилглицеролов с освобождением жирных кислот перед их усвоением клетками вымени (3, 67). Процесс гидролиза приводит к удалению 80 % ядерных триглицеролов и превращению ЛПОНП в более мелкие остаточные частицы или липопротеиды с промежуточной плотностью (ЛППП), которые содержат большую часть первоначальных ядерных эфиров холестерина. Это превращение сопровождается ощутимыми потерями поверхностных компонентов, так как фосфолипиды и холестерол переходят в липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), циркулирующие в плазме крови (68, 93). Расщепление липопротеидных комплексов происходит в эндотелии капилляров, где содержится основная часть тканевой липопротеиновой липазы (70). В результате такого расщепления жирные кислоты поступают в ткани молочной железы в свободной форме. Но не исключено, что часть липопротеидов переходит в ткань без глубокого расщепления (32). Lascelles A.K. и др. (56) при внутривенном введении козам

меченых хиломикронов обнаружили их большое поглощение молочной железой уже в первые 20 минут, следовательно потребление возможно и через капиллярные поры.

Известно, что в липопротеидах очень низкой плотности у коров содержится 55-70% триацилглицеролов, 10-20% фосфолипидов, около 15% общего холестерина, а также 5-10% белка (36). В липопротеидах более высокой плотности преобладающими фракциями являются фосфолипиды, холестерол и его эфирсвязанные формы. Вероятно, перенос веществ этих классов в иных связанных формах затрудняет их усвоение молочной железой. Но при гидролизе ЛПОНП у крыс, и вероятно жвачных, часть фосфолипидов может не переходить в состав ЛПВП, а поглощаться тканями (34). У коров этот процесс, возможно, способствует распределению в тканях организма небольших количеств незаменимых жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов и эфиров холестерола. Так известно, что эти фракции содержат не только большое количество пальмитиновой, но и линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот (83). Способность существенного увеличения содержания линолевой кислоты в фосфолипидах и эфирах холестерола, при этом без влияния на триацилглицеролы, объясняется ее ограниченным поступлением из тонкого кишечника, а также различными скоростями обмена и гидролиза липидов разных классов в плазме крови, так как фактически большинство эфиров холестерола образуются в системе лецитин – холестерол-ацилтрансфераза, обладающей высокой специфичностью для транспорта линолевой кислоты (73, 74).

Следовательно, вопрос об использовании липидов таких классов как фосфолипиды, свободный и эфирсвязанный холестерол на пике лактации остается открытым. В литературе встречаются взаимоисключающие данные – от полного отрицания их использования (43) до свидетельствующих о вероятности поглощения молочной железой коров (51, 92). Но не исключается, что они, как главные в количественном отношении фракции липидов в плазме крови, косвенным образом участвуют в образовании компонентов молочного жира через реакции переэтерификации с образованием триглицеролов в печени.

Дополнительным источником высокомолекулярных жирных кислот жира молока являются неэстерифицированные жирные кислоты (НЭЖК), поступающие из плазмы артериальной крови. НЭЖК участвуют в формировании фонда кислот в секреторных клетках молочной железы путем обмена с жирными кислотами, освобождающимися при расщеплении триацилглицеролов ЛПОНП. Так, Медведев И.К. (11) не обнаружил ощутимой артерио-венозной разности НЭЖК по вымени и предположил, что у накормленных животных они полностью обмениваются с жирными кислотами триацилглицеролов. При незначительной АВР неэстерифицированных жирных кислот наблюдалось большое уменьшение их радиоактивной метки в венозной крови и ее включение

в молочный жир. Это сопровождалось изменением количественного соотношения отдельных жирных кислот, поступающих в венозную кровь из ткани молочной железы, а также изменением жирнокислотного состава триацилглицеролов в вене. Однако по данным Kronfeld D.S. (53), наблюдается довольно высокая артерио-венозная разность НЭЖК, связанная с их концентрацией в плазме крови, даже у сытых животных. У голодных животных (не менее суток) освобождается меньше жирных кислот триацилглицеролов и, соответственно, возрастает АВР НЭЖК (19). В раннюю фазу лактации наблюдается увеличение содержания НЭЖК в артериальной крови, свидетельствующее об усилении мобилизации жирных кислот из жировых депо организма, так как эта мобилизация является лимитирующим фактором для плазменных НЭЖК (65). Этот процесс имеет отрицательную взаимосвязь с β -оксимасляной кислотой в крови артерии (64). Различные данные относительно поглощения неэтерифицированных жирных кислот молочной железой, по-видимому, говорят не только о большой зависимости этого метаболита от стадии лактации, но и от индивидуальных особенностей животных. Об этом факте свидетельствует цифровой материал, полученный Annison E.F. и др. (18), в котором представлен большой разброс данных по артерио-венозной разности НЭЖК в зависимости от рациона и индивидуального животного.

Известно, что высокомолекулярные жирные кислоты триацилглицеролов и НЭЖК напрямую включаются в жир молока. Молочная железа поглощает намного больше стеариновой кислоты, чем олеиновой, в то время как молочный жир содержит в 2-4 раза больше олеиновой кислоты. Доказано, что вымя обладает активной ферментной системой биосинтеза ненасыщенных жирных кислот из насыщенных (27, 50, 52). Десатуразы – ферменты, ответственные за денасыщение, располагаются в микросомах клетки и регулируются НАДФ. Они в меньшей степени активны по отношению к пальмитиновой кислоте и совсем не активны в отношении лауриновой и миристиновой кислот. Десатурации не происходит за пределами моноеновых кислот (61).

Поглощение большого количества незаменимых жирных кислот молочной железой обусловлено не только их секрецией в составе молочного жира, но и использованием на другие потребности. Они активно включаются в синтез фосфолипидов, клеточных простагландинов и лейкотриенов. Особенно активна в этом отношении арахидоновая кислота (45, 46). Жирные кислоты в составе триацилглицеролов поглощаются в меньших количествах, чем их требуется для синтеза жира молока. Поэтому вымя поглощает ацетат и β -оксибутират, что в достаточной степени удовлетворяет потребности этого синтеза (16). Доказано, что обеспеченность этими субстратами может лимитировать образование молочного жира (13, 25). Уксусная и β -оксимасляная кислоты являются

основными предшественниками большинства низко- и значительной части среднецепочных жирных кислот молочного жира. Но в каждый данный момент их относительное участие в биосинтезе может быть различным.

Второй компонент кетонных тел в крови – ацетоуксусная кислота не используется выменем на пике лактации, но в период недостатка ацетата и β -оксибутирата может утилизироваться молочной железой. Пропионовая и масляная кислоты активно поглощаются молочной железой, но не используются на синтез жира молока (80). Теоретически пропионат мог бы участвовать в прямом синтезе жирных кислот, поскольку он может включаться в лимоннокислый цикл с последующим расщеплением цитрата до оксалоацетата и ацетил-КоА и превращением оксалоацетата в ацетил-КоА через малат и пируват. Однако ограниченная активность АТФ-зависимой цитратлиазы и малатдегидрогеназы не позволяет придавать пропионату большого значения для липогенеза (41). Следовательно, можно говорить только об опосредованном участии пропионата и бутирата в синтезе компонентов молока, хотя они и оказывают влияние на этот процесс (77).

На основе имеющихся данных принято считать, что у жвачных жирные кислоты молочного жира от C_4 до C_{12} синтезируются в молочной железе, C_{12} - C_{16} имеют двойное происхождение, а C_{18} и выше происходят из триацилглицеролов и НЭЖК крови (17, 22, 57, 48). Предшественниками первой группы жирных кислот молока являются ацетат и β -оксимасляная кислота (54). Причем около 30% лауриновой кислоты синтезируется из триацилглицеролов плазмы, тогда как их вклад в мристиновую кислоту составляет уже около 70%, а в пальмитат 80% (20).

Синтезная система, катализирующая синтез жирных кислот в растворимой фракции цитоплазмы, ответственна за несколько реакций, при которых одна молекула ацетил-КоА и семь молекул малонил-КоА конденсируются с образованием одной молекулы жирной кислоты, где восстановление осуществляется за счет НАДФ*Н (малониловый путь). Единственная молекула ацетил-КоА, необходимая для реакции, служит ее инициатором (97). Карбоксилирование ацетил-КоА с образованием малонил-КоА катализируется ацетил-КоА карбоксилазой, содержащей в качестве простетической группы биотин, и располагающейся в цитозоле и микросомах клетки (33, 96). Участие биотина в карбоксилировании ацетил-КоА установлено по способности авидина тормозить эту реакцию и по образованию CO_2 -биотинферментного комплекса, как промежуточного продукта, характерного для реакций карбоксилирования. Еще одна отличительная особенность механизма синтеза жирных кислот заключается в том, что ацильные промежуточные продукты в этом процессе представляют собой не тиоэфиры КоА, как при окислении жирных кислот, а тиоэфиры низкомолекулярного белка, которым

является ацилпереносящий белок. Этот белок может образовывать комплексы с одним или несколькими другими ферментами, необходимыми для синтеза жирной кислоты.

Реакция ацетил-КоА с малонил-КоА и НАДФ*Н, в результате которой образуется, как правило, пальмитат, катализируется синтетазой жирных кислот, которая представляет собой мультиферментный комплекс, располагающийся в цитозоле. В опытах с изотопами установили, что из ацетил-КоА происходит метильная группа образуемой жирной кислоты, следовательно, механизм конденсации ацетил-КоА с малонил-КоА при формировании цепи жирной кислоты, сопровождается одновременным выделением CO_2 . Образовавшаяся пальмитиновая кислота может затем удлиниться присоединением одной или более единиц ацетил-КоА с образованием более высокомолекулярных кислот. После процесса десатурации, пальмитолеиновая и олеиновая кислоты также могут присоединять ацетил-КоА, что дает начало более длинноцепочным ненасыщенным жирным кислотам (89). Факторы, управляющие длиной цепи синтезируемых жирных кислот, полностью неизвестны и, вероятно, больше связаны с влиянием длины цепи на присоединение жирных кислот к ферменту (59), чем со специфичностью фермента. Концентрация малонил-КоА также оказывает влияние на скорость синтеза и длину цепи (24). Наличие кислот с короткой цепью в молочном жире жвачных представляет интерес тем, что они могут активировать отщепление ацетил-КоА, что тем самым приводит к прекращению дальнейшего удлинения цепи.

Наряду с синтезом кислот через малонил-КоА, в молочной железе существуют и немалонильные пути синтеза жирных кислот. Об этом свидетельствуют данные о преимущественном включении меченого ацетата в C_{10} - C_{14} по сравнению с включением в более короткоцепочечные C_4 - C_8 и отсутствие тормозящего эффекта авидина на синтез этой группы жирных кислот (86). Опыты с перфузированной молочной железой крупного рогатого скота (91) показали, что кислоты с короткой или промежуточной длиной цепи при добавлении 2-х углеродных единиц могут наращивать свою длину. Этот процесс может доходить до синтеза стеариновой кислоты, в которую также включается ацетат (80, 86). Одним из немалонильных путей является использование β -оксибутирата в синтезе жирных кислот молочного жира. Обычно он идет на синтез кислот, содержащих менее 16 атомов углерода, как 4-х углеродная единица для наращивания цепи с метильного конца. Некоторое количество β -оксимасляной кислоты превращается в ацетат, но так как этот процесс осуществляется в митохондриях (из-за локализации β -оксибутиратдегидрогеназы), то образующаяся этим путем уксусная кислота используется для окисления или удлинения жирных кислот, но не для синтеза кислот в цитозоле (76, 80).

Несмотря на большое количество исследований, расчет потребностей молочной железы в отдельных субстратах достаточно сложен из-за многогранности путей преобразования поглощаемых метаболитов в составные части молока. Одним из самых сложных аспектов является оценка синтеза жирных кислот молока из нутриентов артериальной крови. Поэтому нами была поставлена цель, воспроизвести количественное моделирование процессов биосинтеза жирных кислот молочного жира, учитывая комплексное влияние их предшественников.

Материалы и методы

Опыт проведен на четырех 3-летних коровах-аналогах чернопестрой породы, живой массой 380-450 кг и удоем за 305 дней предшествующей лактации 4000-4500 кг молока (табл. 1). Животных содержали на привязи в стандартных стойлах. Кормление коров было 3-х разовым. Во время исследований коровы оставались нестельными. Целью использования нестельных коров в период опыта являлось исключение влияния плода при оценке транспорта метаболитов к молочной железе в заключительный период лактации.

Таблица 1. Характеристика подопытных животных

Показатели	№ животных				В среднем
	1	2	3	4	
2-4 месяц (пик лактации)					
Живая масса, кг	435	431	387	405	414,5±11,32
Суточный удой, кг	15,6±0,6	16,5±0,8	17,0±0,5	17,9±0,7	16,8±0,5
Молочный жир, %	3,42±0,07	3,29±0,16	3,16±0,07	3,13±0,21	3,25±0,07
Артериальный кровоток, л/мин					7,789±0,149
Приток крови на 1 кг молока					678,32±40,53
9-10 месяц (спад лактации)					
Живая масса, кг	465	431	388	420	426,0±15,88
Суточный удой, кг	5,42±0,10	6,02±0,06	7,63±0,23	6,07±0,11	6,29±0,47
Молочный жир, %	3,52±0,06	3,79±0,04	3,26±0,05	3,54±0,05	3,53±0,11
Артериальный кровоток, л/мин					2,094±0,127
Приток крови на 1 кг молока					603,12±36,67

Рацион коров составляли согласно их потребностям, рассчитанным по алгоритмам норм питания, рекомендуемых ВНИИФБиП и разработанных на основе данных, полученных при изучении трансформации питательных веществ корма в организме животных. Коров кормили сеном, силосом, свеклой и комбикормом, сочетая эти корма в зависимости от стадии лактации (табл. 2).

Таблица 2. Структура рационов коров в период опыта

Серия опыта	Кол-во голов	Суточная дача кормов, кг				
		сено злак.-бобов.	силос		свекла кормовая	комбикорм
			вико-овс.	куку-рузн.		
1	4	3,0	–	14,0	12,0	6,3
2	4	2,0	20,0	–	–	3,0

Состав комбикорма, скармливаемого коровам, в процессе эксперимента не изменялся. Основу комбикорма составляло зерно кукурузы – 35%. В состав комбикорма также входили такие компоненты как зерно ячменя – 15,5%; зерно пшеницы – 20,0%; шрот подсолнечниковый – 25,0%; фосфат кормовой – 2,0%; соль поваренная – 1,5%; премикс – 1,0%.

Для изучения количественного транспорта высокомолекулярных жирных кислот, ацетата и β -оксимасляной кислоты у животных отбирали пробы крови из сонной артерии и одной из молочных вен. В молоке коров определяли: общие липиды, жирные кислоты и содержание жира. Для сбора образцов крови животные были оперированы с целью выведения наружной сонной артерии (a. carotis externa) под кожу в плексигласовую «лодочку».

Во время опыта изучали динамику кровотока в молочной железе (табл. 1) с целью количественного определения поглощения субстратов крови выменем коров и их влияния на формирование жирнокислотного состава молока.

Для имплантации ультразвуковых датчиков объемного кровотока использовали 3-х коров черно-пестрой породы. Определяли суточную динамику кровотока. В исследованиях использовали двухканальный ультразвуковой флоуметр Transonic Systems Inc. NT 207 (производитель Transonic Systems Inc. Ithaca, New York, USA).

Результаты и обсуждение

Оптимальное обеспечение физиологических и биохимических процессов в молочной железе достижимо лишь при знании путей перераспределения и усвоения метаболитов, эффективности их использования на физиологические функции и механизмов, регулирующих распределение субстратов для нужд вымени в зависимости от внешних и внутренних факторов. Поглощение метаболита выменем зависит от наличия субстратов в крови и скорости кровотока молочной железы. Для получения количественных величин усвоения наиболее приемлемым методом, обеспечивающим более точную оценку поглощения многих метаболитов, является экспериментальное измерение артерио-венозной раз-

ности (62, 63). Ввиду специфичности определения поглощения, такие метаболиты как кетоновые тела, классы липидов и ВМЖК крови определяются в плазме артериальной крови с учетом коэффициента гематокрита. В наших исследованиях отношение столба плазмы к общему количеству цельной крови в среднем равнялось 0,7 (70%), что соответствует общепринятому по литературным данным (88).

Полученные в эксперименте данные (табл. 3), позволяют получить представление о количественном поглощении ацетата, β -оксибутирата и высокомолекулярных жирных кислот выменем лактирующих коров. На основе данных объемной скорости кровотока вычислено суточное потребление этих метаболитов молочной железой, которое показывает динамику усвоения в зависимости от стадии лактации.

Для уточнения потоков жирных кислот в системе: кровь-вымя-молоко, нами создана эскизная модель (схема), построенная на основе полученных в эксперименте (табл. 3) и литературных данных. При обобщении полученных результатов был проведен многосторонний балансовый расчет, основанный на молекулярных коэффициентах синтеза, целью которого было достижение как можно более равновесного состояния системы. Данная модель описывает основные метаболические пути высокомолекулярных жирных кислот в молочной железе и позволяет развить представления об усвоении субстратов лактирующими молочными коровами. При этом характер поглощения специфичен для каждого метаболита и требует индивидуальной оценки взаимосвязи с компонентами, включаемыми в молоко и энергетическими затратами в органе.

Таблица 3. Использование метаболитов молочной железой коров

Показатели	Пик лактации			Спад лактации		
	артерия, г/л	АВР, г/л	в сутки, г/л	артерия, г/л	АВР, г/л	в сутки, г/л
Ацетат	0,0761± ±0,0022	0,0388± ±0,0022	435,22± ±25,83	0,0549± ±0,0059	0,0271± ±0,0045	81,67± ±13,91
β - оксибутират	0,0585± ±0,0031	0,0119± ±0,0027	133,59± ±22,83	0,0231± ±0,0021	0,0122± ±0,0018	36,78±5,86
C ₆ -C ₁₀	0,0211± ±0,0002	0,0018± ±0,0001	19,96±0,68	0,0183± ±0,0010	0,0021± ±0,0009	6,37±0,86
C ₁₂	0,0198± ±0,0003	0,0006± ±0,0001	6,90±1,17	0,0186± ±0,0004	0,0020± ±0,0007	6,06±1,43
C ₁₄	0,0446± ±0,0005	0,0009± ±0,0001	9,90±1,55	0,0366± ±0,0034	0,0040± ±0,0010	12,15±3,54
C ₁₆	0,2472± ±0,0013	0,0074± ±0,0010	82,98±8,22	0,2499± ±0,0005	0,0024± ±0,0007	7,26±1,53
C _{16:1}	0,0112± ±0,0002	0,0005± ±0,0001	5,71±0,44	0,0110± ±0,0005	0,0013± ±0,0002	3,76±0,67
C ₁₈	0,3397± ±0,0015	0,0032± ±0,0006	36,22±4,44	0,3543± ±0,0015	0,0063± ±0,0012	18,89±1,63

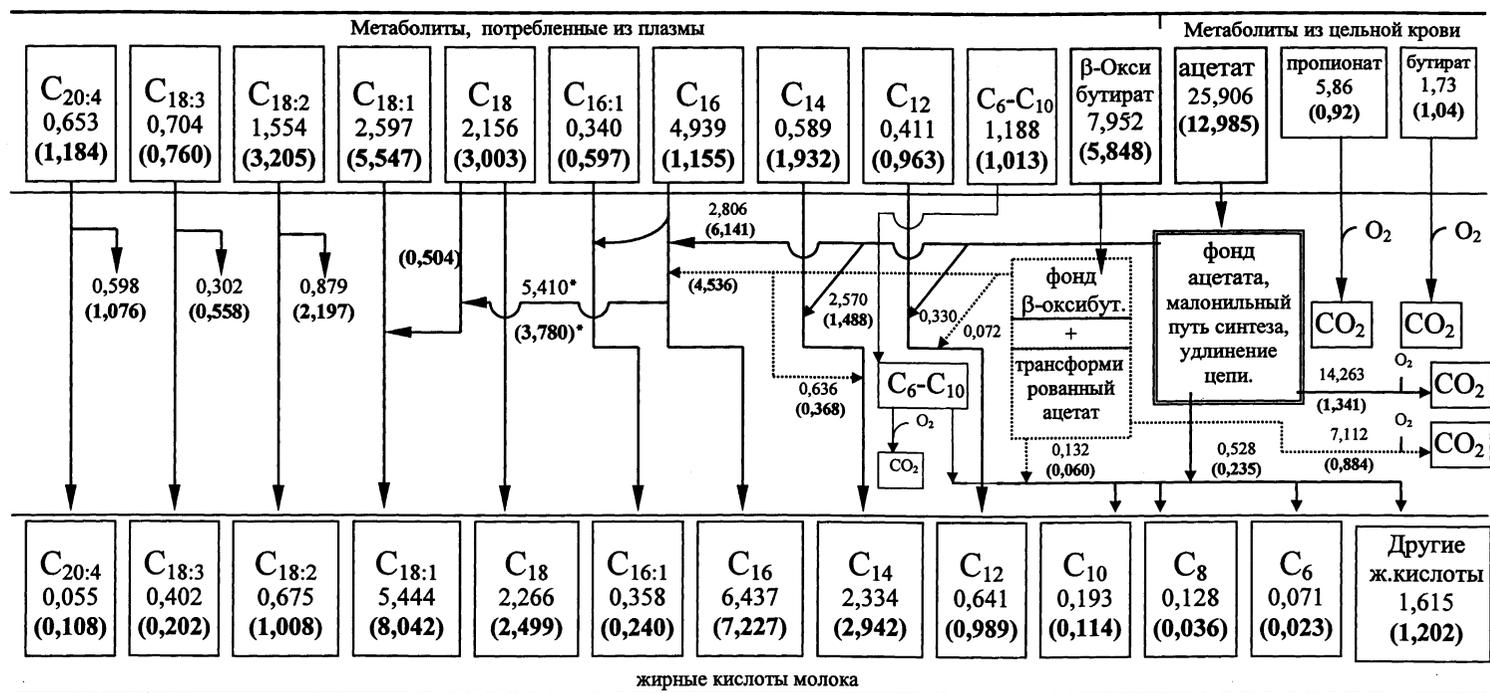
C _{18:1}	0,3397± ±0,0014	0,0039± ±0,0007	43,63±5,12	0,3727± ±0,0230	0,0116± ±0,0004	34,89±7,77
C _{18:2}	0,3381± ±0,0016	0,0023± ±0,0007	26,11±5,64	0,3270± ±0,0010	0,0070± ±0,0010	20,16±2,51
C _{18:3}	0,0361± ±0,0007	0,0011± ±0,0005	11,83±2,71	0,0325± ±0,0005	0,0016± ±0,0006	4,78±1,35
C _{20:4}	0,0143± ±0,0003	0,0010± ±0,0003	10,97±2,18	0,0167± ±0,0010	0,0025± ±0,0005	7,45±1,29

Известно, что количественно наиболее важными субстратами для синтеза молока у жвачных являются глюкоза, ацетат, β-оксибутират, плазменные липиды и аминокислоты. При этом, наибольшую сложность представляет расчет поступления и утилизации предшественников молочного жира. Известно, что предшественниками жирных кислот молока являются триацилглицеролы плазмы, уксусная и β-оксимасляная кислоты, причем вклад этих метаболитов в жирнокислотный состав молока сильно варьирует. Суточное поглощение ацетата и β-оксибутирата находилось на уровне 435–81 и 133–36г, соответственно, в зависимости от уровня секреции молока (табл. 3). Подобные данные были получены Bickerstaffe R. и др. (28). Имеются данные по отрицательной взаимосвязи этих метаболитов, как конкурирующих в молочной железе лактирующих коров (90, 95). Но их поглощение сильно взаимосвязано с концентрацией в крови артерии (66).

По литературным данным выяснено, что динамика ацетата и β-оксибутирата в артериальной крови и поглощенных выменем достоверно зависит от величины молочной продуктивности животных (2, 10). При проведении балансового расчета нами была предпринята попытка обобщить имеющиеся данные по усвоению высокомолекулярных жирных кислот, ацетата и β-оксимасляной кислоты в количественном аспекте при контрастных уровнях молочной продуктивности (схема). Ацетат и β-оксибутират используются как 2-х и 4-х углеродные единицы для синтеза жирных кислот в молочной железе, причем из последнего также может образовываться уксусная кислота (71). Известно, что уксусная кислота является наиболее активно усвояемым метаболитом для синтеза жирных кислот и энергетических потребностей в молочной железе жвачных. Из нее может синтезироваться около 40% жирных кислот молока (20, 28). При этом принято считать, что вымя жвачных окисляет от 30 до 50% общего поступившего количества ацетата, а остальное количество используется для синтеза молочного жира (58, 72, 85). В представленной модели допускали, что уксусная и β-оксимасляная кислоты восполняют недостающее количество синтезированных кислот молока. При этом считали, что жирные кислоты C₁₂-C₁₆, поступившие из плазмы крови, утилизируются на синтез целиком, а их окисление незначительно (21). Таким образом, основанное на расчетах

по молекулярным коэффициентам использования количество ацетата, пошедшее на синтез жирных кислот молока, составило 45 и 89% при удое 17-15 и 6-4 л, соответственно. По схеме видно, что из этого метаболита образовалось 33 и 27% жирных кислот молочного жира. На основе балансового расчета на входе и выходе системы выявлено недостаточное поступление олеиновой кислоты с триацилглицеролами плазмы и недостаточное количество стеарата для восполнения этого дефицита. Следовательно можно предположить, что $C_{18:1}$ образуется путем десатурации в молочной железе коров из C_{18} , которая в свою очередь образуется удлинением цепи пальмитиновой кислоты при участии ацетата. Возможность такого пути использования уксусной кислоты обосновали Annison E.F. и др. (19) и Kinsella J.E. (49). Его возникновение особенно вероятно на спаде лактации, когда происходит увеличение концентрации C_{16} в молоке и одновременное снижение ее усвоения железой.

Схема. Количественный транспорт предшественников основных жирных кислот молочного жира, (г/л молока)



Примечание: первыми приведены потоки метаболитов при удое 17-15 л, в скобках при удое 6-4 л.

* Транспорт метаболита приведен в ацетатном эквиваленте.

Использование β -оксибутирата для синтеза жирных кислот молока на пике лактации незначительное и составляет около 11% от общего количества. Его вклад в жирные кислоты в это время составляет менее 10% от их суммы (1, 76). По нашим данным, в период наибольшей продуктивности из β -оксимасляной кислоты синтезируется около 3% жирных кислот молочного жира, но по мере снижения удоя это количество линейно возрастает до 15% (использование на синтез до 85%), что связано с сильным снижением использования ацетата и плазменных триацилглицеролов. В основном β -оксибутират используется для синтеза кислот группы C_4 - C_{12} (75), но в связи с большим дефицитом предшественников пальмитата на спаде лактационной активности, возможно предположить его участие в образовании и этой жирной кислоты молока. Таким образом, можно заключить, что при недостатке поглощения ацетата в молочной железе при удое 6-4 л, усиливается немалонильный путь синтеза жирных кислот молочного жира. Уменьшение окисления уксусной и β -оксимасляной кислот в связи с их использованием на возросшую потребность синтеза некоторых жирных кислот молока при снижении удоя, не соответствует литературным данным. Это объясняется тем, что большинство работ других авторов по количественному расчету использования метаболитов молочной железой проводилось в период наибольшей продуктивности животных.

Как показали наши исследования, вымя коров активно использует пропионат и бутират. По-видимому, эти летучие жирные кислоты используются на энергетические нужды железы наравне с ацетатом (29, 42). При этом встречающиеся в литературе данные об увеличении поглощения пропионовой кислоты в связи с повышением секреции молока (82), не доказывают его связь с выходом молочных компонентов. Это влияние опосредовано через энергетические потребности. Наблюдается конкуренция между использованием β -оксимасляной и масляной кислот на энергетические затраты органа (37).

Поглощение жирных кислот выменем коров в наших исследованиях варьирует в обычных пределах (табл. 3), согласующихся с литературными данными (4, 7). Исследованию метаболизма жирных кислот в молочной железе всегда уделялось большое внимание. Однако в большинстве работ содержание метаболитов в молоке не увязывалось с их поглощением из артериальной крови, что необходимо для выяснения путей распределения. В представленной модели использования плазменных жирных кислот в вымени (схема) полагали, что кислоты группы C_{12} - $C_{16:1}$ напрямую используются для их выхода с молоком или для удлинения углеродной цепи. Более низкомолекулярные жирные кислоты окисляются, но возможно предположить их участие и в синтезе кислот молока через доразвивание углеродной цепи (8). Молочная железа поглощает намного большее количество незаменимых кислот – линоле-

вой, линоленовой и арахидоновой, чем секретирует их с молоком. Вероятно при этом действует другой путь утилизации. Так известно, что $C_{18:2}$ - $C_{20:4}$ могут включаться в состав фосфолипидов (9) и использоваться на синтез более высокомолекулярных ненасыщенных жирных кислот (6). Арахидоновая кислота также активно поглощается для синтеза простагландинов (31).

Жирнокислотный состав молока при снижении удоя изменяется неравномерно. Так в связи с уменьшением секреторной активности молочной железы, концентрация жирных кислот C_6 - C_8 уменьшается, а C_{12} - C_{16} имеет тенденцию к возрастанию. Сильное повышение концентрации в молочном жире наблюдалось у олеиновой, линолевой и арахидоновой кислот, что согласуется с общими представлениями об изменчивости жирных кислот молока в течение лактации (12, 84). Такая динамика скорее всего связана со снижением поступления энергии в организм животных, так как многие авторы указывают на возможность количественного изменения жирных кислот молока путем изменения доступности энергии рациона (14, 35).

Заключение

Таким образом, модель образования основных жирных кислот молочного жира позволяет количественно представить некоторые потоки высокомолекулярных жирных кислот в молочной железе. Представленная модель является эскизной, в ней существуют некоторые допущения, но баланс нутриентов, приведенный в работе, вычислен на основе имеющихся современных представлений о путях использования метаболитов в вымени коров. При этом предполагается, что синтезирующая способность молочной железы является определяющим фактором поглощения питательных веществ.

Эта работа уточняет общий алгоритм использования субстратов в организме коров для синтеза молочного жира, что в дальнейших разработках позволит более точно балансировать кормление для достижения лучшего обеспечения молочной железы энергетическими и пластическими метаболитами, необходимыми при синтезе компонентов молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алимова Е.К. Биосинтез глицеридов в различных тканях животного организма. В кн.: Балашова И.А. (Ред.) Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции. М: Наука, 1977: 5-15.
2. Бондаренко Г.А., Гусева Н.И. Метаболиты крови у коров холмогорской породы контрастных по величине удоя, процентам жира и белка в молоке и сочетанию этих показателей. В кн.: Физиол.-биохим. и генетич. основы

- повышения эффектив. использования кормов в животноводстве. Боровск, ВНИИФБиП, 1973: 188-190.
3. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. М.: Мир, 1978: 121-128.
 4. Заболотнов Л.А., Лысов А.В. Взаимосвязь содержания арахидоновой кислоты в липидах плазмы крови артерии и воротной вены у коров. В кн.: Проблемы физиол., биохим., биотехн. и питания с.-х. животных. Боровск, ВНИИФБиП, 1994: 62-63.
 5. Кармолиев Р.Х. Молекулярные механизмы метаболизма липопротеидов сыворотки крови в организме лактирующих коров. Доклады ВАСХНИЛ, 1987, 7: 26-29.
 6. Ленинджер А. Биохимия. М: Мир, 1974: 603-604.
 7. Лысов А.В. Метаболизм каприловой и каприновой жирных кислот в организме высокопродуктивных коров. В кн.: Проблемы физиол., биохим., биотехн. и питания с.-х животных. Боровск, ВНИИФБиП, 1993: 110-112.
 8. Лысов А.В. Поглощение высокомолекулярных жирных кислот молочной железой высокопродуктивных коров. Там же, 107-110.
 9. Лысов А.В. Зависимость содержания жирных кислот в липидах молока коров от жирнокислотного состава потребляемого рациона в первую фазу лактации. Там же, 1994: 58-59.
 10. Мартюшов В.М. Синтез ЛЖК в рубце и концентрация их в артериальной крови у сухостойных и лактирующих коров в зависимости от уровня кормления. Там же, 1994: 46-47.
 11. Медведев И.К. Биохимия синтеза жира молока. В кн.: Барышников И.А. (Ред.) Физиология и биохимия лактации (Труды второго симпозиума). Л: Наука, 1972: 59-76.
 12. Медведев И.К. О биосинтезе и секреции белков и жира молока у жвачных животных. Автореф. дис... д.б.н., Боровск, 1978: 6-18.
 13. Овчаренко Э.В. Физиологические основы питания и молокообразования у коров в ранний период лактации в связи с уровнем и качеством энергии и протеина в рационе. Автореф. дис... д.б.н., Боровск, 1991: 36-38.
 14. Овчаренко Э.В., Ильченко М.Д., Исламова Н.И., Медведев И.К. Обмен липидов у высокопродуктивных коров в начале лактации при разных уровнях кормления. В кн.: Липидный обмен у сельскохозяйственных животных. Боровск, ВНИИФБиП, 1974: 127-134.
 15. Полетаев П.В. Физиология и биохимия жирномолочности коров. М.: Колос, 1972: 113-131.
 16. Фолли С. Физиология и биохимия лактации. М: Изд.Ин.Лит., 1962: 165-198.
 17. Эрнст Л.К. Биологические основы повышения жирномолочности коров. М: Россельхозиздат, 1977: 23-32.
 18. Annison E.F., Bickerstaffe R., Linzell J.L. Glucose and fatty acid metabolism in cows producing milk of low fat content. J. Agric. Sci. (Camb.), 1974, 82, P1: 87-95.
 19. Annison E.F., Linzell J.L., Fazakerley S., Nichols B.W. The oxidation and utilization of palmitate, stearate, oleate and acetate by the mammary gland of the fed goat in relation to their overall metabolism and the role of plasma

- phospholipids and neutral lipids in milk-fat synthesis. *Biochem. J.*, 1967, 102: 637-647.
20. Baldwin R.L. Mammary growth and lactation. In: Cole H.H., Cupps P.T. (Eds.) *Reproduction in domestic animals*. A.P. New York, London, 1969: 458-465.
 21. Baldwin R.L., Smith N.E. Adaptation of metabolism to various conditions: milk production. In: (Ed) Riis P.M. *Dynamic Biochemistry of animal production*. Elsevier Sci. Publ., B.V., Amsterdam, 1983: 359-388.
 22. Barry J.M. Quantitative balance between substrates and metabolic products of the mammary gland. *Biol. Rev.*, 1964, 39: 194-213.
 23. Barry J.M., Bartley W., Linzell J.L., Robinson D.S. The uptake from the blood of triglyceride fatty acids of chylomicra and low-density lipoproteins by the mammary gland of the goat. *Biochem. J.*, 1963, 89: 6-11.
 24. Bartley J.C., Abraham S., Chaikoff I.L. Factors influencing the pattern of fatty acids synthesised by cell-free preparations of lactations of lactating rat mammary gland. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1967, 144, 1: 51-60.
 25. Bauman D.E., Brown R.E., Davis C.L. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow and cow. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 140: 237-243.
 26. Bauman D.E., Davis C.L. Biosynthesis of milk fat. In: Larson B.L., Smith V.R. (Eds.) *Lactation. A comprehensive treatise*. Vol. II. A.P. New York., 1974: 31-75.
 27. Bickerstaffe R., Annison E.F. The desaturase activity of goat and sow mammary gland. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1971, 35: 653-665.
 28. Bickerstaffe R., Annison E.F., Linzell J.L. The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. *J. Agr. Sci. (Camb.)*, 1974, 82, P1: 71-85.
 29. Bines J.A., Brown R.E. Incorporation of carbon from acetate and butyrate into milk components. *J. Dairy Sci.*, 1968, 51, 5: 698-705.
 30. Bishop C., Davies T., Glascok R.F., Welch V.A. Studies on the origin of milk fat. A further study of bovine serum lipoproteins and an estimation of their contribution to milk fat. *Biochem. J.*, 1969, 113: 629-631.
 31. Crawford M.A. Essential fatty acids and prostaglandins. *J. Nature.*, 1980, 287, 2: 784-791.
 32. Dimick P.S., McCarty R.D., Patton S. Structure and synthesis of milk fat. VII. Distribution of fatty acids in milk fat triglycerides with special reference to butyrate. *J. Dairy Sci.*, 1965, 48: 735-740.
 33. Easter D.J., Dils R. Fatty acid biosynthesis. IV. Properties of acetyl-CoA carboxylase in lactating-rabbit mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1968, 152: 653-668.
 34. Eisenberg S., Levy R.I. Lipoprotein metabolism. *Adv. Lipid Res.*, 1975, 13: 1-89.
 35. Emmanuel B., Kennelly U. Effect of propionic acid on ketogenesis in lactating sheep fed restricted rations or deprived of food. *J. Dairy Sci.*, 1984, 67: 344-347.
 36. Ferreri L.F., Elbein R.C. Fractionation of plasma triglyceride-rich lipoproteins of the dairy cow: evidence of chylomicron sized particles. *J. Dairy Sci.*, 1982, 65: 1912-1920.

37. Forsberg N.E., Baldwin R.L., Smith N.E. Roles of acetate and its interactions with glucose and lactate in cow mammary tissue. *J. Dairy Sci.*, 1984, 67, 10: 2247-2254.
38. Glascock R.F., Welch V.A., Bishop C., Davies T., Wright E.W., Noble R.L. An investigation of serum lipoproteins and their contribution to milk fat in the dairy cow. *Biochem. J.*, 1966, 98: 149-156.
39. Grummer R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 1991, 74, 9: 3244-3257.
40. Hansen R.P., Shorland F.B., Cooke N.J. The branched-chain fatty acids of ox fat. *Biochem. J.*, 1955, 61, 4: 547-548.
41. Hanson R.W., Ballard F.J. The relative significance of acetate and glucose as precursors of lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. *Biochem. J.*, 1967, 105: 529-534.
42. Hardwick D.C., Linzell J.L., Mephram T.B. The metabolism of acetate and glucose by the isolated perfused udder. 2. The contribution of acetate and glucose to carbon dioxide and milk constituents. *Biochem. J.*, 1963, 88: 213-218.
43. Hartmann P.E., Lascelles A.K. The uptake of plasma lipid and some non-lipid constituents by the mammary gland of the cow. *Aust. J. Biol. Sci.*, 1964, 17: 935-954.
44. Hartmann P.E., Lascelles A.K. Variation in the concentration of lipids and some other constituents in the blood plasma of cows at various stages of lactation. *Austr. J. Biol. Sci.*, 1965, 18, 1: 114-123.
45. Horrobin D.F., Manku M.S. Effects of essential fatty acids on prostaglandin biosynthesis. *Biomed. Biochem. Acta.*, 1984, 43, 8: 114-120.
46. Horustra G., Haddeman E. Prostaglandins, essential fatty acid. Platelet function and thrombosis. *Thromb. Res.*, 1974, 4, 1: 91-93.
47. Jensen R.G., Sampugna J. Identification of milk fatty acids by gas-liquid and thin-layer chromatography. *J. Dairy Sci.*, 1962, 45, 3: 435-437.
48. Jones E.A. Recent developments in the biochemistry of the mammary gland. *J. Dairy Res.*, 1969, 36: 145-167.
49. Kinsella J.E. Stearic acid metabolism by mammary cells. *J. Dairy Sci.*, 1970, 53: 1757-1765.
50. Kinsella J.E. Stearoyl-CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: possible regulatory steps in milk triglyceride synthesis. *Lipids* 7, 1972: 349-355.
51. Kinsella J.E., McCarthy R.D. Lipid composition and secretory activity of bovine mammary cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1968, 164: 530-536.
52. Kinsella J.E., Heald C.W. Na[1-¹⁴C]stearate and Na[2-¹⁴C]acetate metabolism and morphological analysis of late parturition bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.*, 1972, 55: 1085-1092
53. Kronfeld D.S. Plasma non-esterified fatty acid concentrations in the dairy cow: response to nutritional and hormonal stimuli and significance of ketosis. *Vet. Rec.*, 1965, 77: 30-34.
54. Kumar S., Singh V.N., Keren-Paz R. Biosynthesis of short-chain fatty acids in lactating mammary supernatant. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1965, 98: 221-229.

55. Kurtz F.E. The lipids of milk: composition and properties. In.: Webb B.H., Johnson A.H. (Eds.) *Fundamentals of dairy chemistry*. A.P.C. Westport, 1965: 91-169.
56. Lascelles A.K., Hardwick D.C., Linzell J.L., Mepham T.B. The transfer of [³H]stearic acid from chylomicra to milk fat in the goat. *Biochem. J.*, 1964, 92: 36-42.
57. Linzell J.L. The magnitude and mechanisms of the uptake of milk precursors by the mammary gland. *Proc. Nutr. Soc.*, 1968, 27: 44-51.
58. Linzell J.L. Mammary blood flow and methods of identifying and measuring precursors of milk. In.: Larson B.L., Smith V.R. (Eds.) *Lactation*, A.P., New York, 1974, 1: 143-225.
59. Lynen F. The role of biotin-dependent carboxylations in biosynthetic reactions. *Biochem. J.*, 1967, 102: 381-400.
60. Mansbridge R.J., Blake J.S. Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *Brit. J. Nutr.*, 1997, 78, 1: 37-47.
61. McDonald T.M., Kinsella J.E. Stearoyl-CoA desaturase of bovine mammary microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, 156: 223-231.
62. McDowell G.H., Gooden J.M., Leenanuruksa D., Jois M., English A.W. Effects of exogenous growth hormone on milk production and nutrient uptake by muscle and mammary tissues of dairy cows in mid-lactation. *Aust. J. Biol. Sci.*, 1987, 40: 295-298.
63. Mercer J.R., Gooden J.M., Teleni E., Hough G.M., McDowell G.H., Annison E.F. Uptake and oxidation of glucose by the hind limb muscle and mammary gland of the lactating ewe. *Proc. Nutr. Soc. Aust. Annu. Conf.*, 1980, 5: 170-175.
64. Metz S.H.M., Lopes-Cardozo M., Bergh S.G. Inhibition of lipolysis in bovine adipose tissue by butyrate and 3-hydroxybutyrate. *FEBS Lett.*, 1974, 47: 19-20.
65. Metz S.H.M., Mulder I., Bergh S.G. Regulation of lipolysis in bovine adipose tissue by the degree of saturation of plasma albumin with fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, 306:42-47.
66. Miller P.S., Reis B.L., Calvert C.C., DePeters E.J., Baldwin R.L. Patterns of nutrient uptake by the mammary glands of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1991, 74, 11: 3791-3799.
67. Moore J.H., Christie W.W. Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. *Progr. Lipid Res.*, 1979, 17, 4: 387-395.
68. Moore J.H., Christie W.W. Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. In.: Christie W.W. (Ed.) *Lipid metabolism in ruminant Animals*. Oxford, P.P., 1981: 227-277.
69. Morrison W.R. Milk lipids. In.: Gunstone F.D. (Ed.) *Topics in lipid research*. L.P., London, 1970, 1: 51-106.
70. Myant N.B. Metabolism of lipids and its defects. *Proceed. Roy. Soc. Med.*, 1971, 64: 893-896.
71. Nandedkar A.K.N., Schirmer E.W., Pynadath T.I., Kumar S. Biosynthesis of fatty acids in mammary tissue. 1. Purification and properties of fatty acid synthetase from lactating-goat mammary tissue. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, 1969, 134, 2: 554-562.
72. Nielsen M.O. Nutrient metabolism in the mammary gland. In.: *A model for the efficient use of new information within physiology, nutrition and breeding of dairy cows*. Foulum, 1990: 49-55.

73. Noble R.C., Crouchman M.L., Moore J.H. Synthesis of cholesterol esters in the plasma and liver of sheep. *Lipids*, 1975, 10: 790-799.
74. Noble R.C., O'Kelly J.C., Moore J.H. Observations on the lecitin: cholesterol acyltransferase system in bovine plasma. *Biochem. et Biophys. Acta*, 1972, 270: 519-528.
75. Palmquist D.L. A kinetic concept of lipid transport in ruminants. A review. *J. Dairy Sci.* 1976, 59: 355-360.
76. Palmquist D.L., Davis C.L., Brown R.E., Sacham D.S. Availability and metabolism of various substrates in ruminants. V. Entry rate into the body and incorporation into milk fat of D(-)- β -hydroxybutyrate. *J. Dairy Sci.*, 1969, 52, 633-638.
77. Pantoja J., Firkins J.L., Eastridge M.L., Hull B.L. Effects of fat saturation and source of fiber on site of nutrient digestion and milk production by lactating dairy cows. *Ohio Agr. Res. and Dev. Cent. (Spec. Circ.)*, 1994, 145: 13-16.
78. Patton S., Jensen R.G. Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. *Progr. Chem. Fats Lipids.*, 1975, 14: 163-277.
79. Popjak G. The metabolism of fat in the mammary gland and fetal tissues with reference to the appreciation of isotope tracers. *Nutr. Abstr. and Rev.*, 1952, 21: 535-541.
80. Popjak G., French T.H., Hunter G.D., Martin S.J.P. Mode of formation of milk fatty acids from acetate in the goat. *Biochem. J.*, 1951, 48: 612-618.
81. Puppione D.L. Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. *J. Dairy Sci.*, 1978, 61, 5: 651-659.
82. Rohr K., Daenicke R. Untersuchungen über den einfluss der fütterungsfrequenz auf die pansenvorgänge, den milchfettgehalt und die futteraufnahme bei milchkuhen. *Landbauforschung Volkenrode*, 1973, 23, 2: 133-139.
83. Saez C. Características de las proporciones de ácidos grasos en las fracciones lipídicas en plasma de vacas holstein lactantes. *Rev. Salud Anim.*, 1984, 6: 661-664.
84. Senft B., Klobasa F. Untersuchungen über das fettsäurespektrum im milchfett schwarzbunter kuhe. *Milchwissenschaft.*, 1970, 25, 9: 514-516.
85. Smith G.H. Crabtree B., Smith R.A. Energy metabolism in the mammary gland. In: Mepham T.B. (Eds). *Biochemistry of Lactation*. Elsevier. Amsterdam - New York, 1983: 121-140.
86. Smith G.H., McCarthy S. Synthesis of milk fat from β -hydroxybutyrate and acetate in mammary tissue in the cow. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1969, 176: 664-671.
87. Smith S., Abraham S. The composition and biosynthesis of milk fat. In: Paoletti R., Kritchevsky D. (Eds.) *Advances in lipid research*. A.P., New York., 1975, 13: 195-239.
88. Stampfli G., Stirnimann J., Kupfer U. Einfluss des laktations-stadiums und der trachtigkeit auf hamatologische und klinisch-chemische werte bei der milchkuh. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1981, 123: 189-205.
89. Storry J.E. Ruminant metabolism in relation to the synthesis and secretion of milk fat. *J. Dairy Res.* 1970, 37, 1: 139-164.
90. Storry J.E., Rook J.A.F. Effect in the cow of intra-ruminal infusions of volatile fatty acids and of lactic acid on the secretion of the component fatty acids of the milk fat and on the composition of blood. *Biochem. J.*, 1965, 96: 210-214.

91. Storry J.E., Tuckley B., Hall A.J. The effects of intravenous infusions of triglycerides on the secretion of milk fat in the cow. *Br. J. Nutr.*, 1969, 23: 157-161.
92. Thompson G.E. Mammary extraction of plasma triglycerides in the cow during lactogenesis. *Comp. Biochem. and Physiol. B.*, 1989, 94, 2: 411-413.
93. Vernon R.G. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. In.: Christie W.W. (Ed.) *Lipid metabolism in ruminant Animals*. Oxford, P.P., 1981: 279-362.
94. Vernon R.G., Flint D.J. Lipid metabolism in farm animals. *Proc. Nutr. Soc.*, 1988, 47: 287-293.
95. Vojtisek B., Hamrik J., Hronova B., Diblikova I., Minskova E. Pouziti octanu sodneho v krmnych davkach ketoznich krav. *Vet. Med. (CSSR)*., 1989, 34, 10: 585-592.
96. Volpe J.J., Vagelos R.P. Mechanisms and regulation of biosynthesis of saturated fatty acids. *Phys. Rev.*, 1976, 56, 2: 339-417.
97. Wakil S.J. Fatty acid metabolism. In.: Wakil S.J. (Ed.) *Lipid metabolism*. A.P., Ney York et al., 1970: 1-4.

ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАТЕМАТИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ЗАВИСИМОСТИ УДОЕВ МОЛОКА ОТ СТАДИИ ЛАКТАЦИИ И СТЕЛЬНОСТИ КОРОВ

Ю.Т. Токарев, Т.Ю. Токарев

Лаборатория молекулярной генетики и радиационного анализа; отдел анализа, планирования и координации комплексных исследований

Обосновано использование гамма-функций для описания изменения удоев под влиянием стадии лактации и сложной экспоненциальной функции – для аппроксимации изменения удоев под влиянием стельности. Установлено, что использование этих уравнений позволяет достаточно точно определять изменение удоев коров стада от отела до запуска при различной продолжительности сервис-периода. Материалы работы могут быть использованы при разработке корректировочных коэффициентов удоев на продолжительность сервис – периодов.

Введение

Точность оценки генотипов коров по молочной продуктивности значительно понижается под влиянием паратипических факторов, к которым относится, наряду с другими, продолжительность сервис-

периода. Изменение этого фактора обуславливает уменьшение или увеличение периода лактирования без влияния стельности, что приводит к изменению продуктивности коров.

Оценить влияние продолжительности сервис-периода на удои коров возможно на основании исчерпывающей информации о закономерностях изменения удоев под влиянием стадий лактации и стельности.

В подавляющем большинстве работ, посвященных изучению изменения удоев под влиянием этих факторов, рассматривается динамика надоев молока от конкретных животных на протяжении отела до сухостойного периода. При этом у коров с течением времени наряду со стадиями лактации и стельности изменяются кормовые, климатические и многие другие факторы, существенно влияющие на продуктивность животных. При таком подходе к исследованию выделить влияние на удои только стадии стельности чрезвычайно трудно.

С разработкой новой методологии описания изменений количественных признаков под влиянием временных средовых факторов в больших группах особей [1] представляется возможность проследить изменение среднестадных удоев коров под влиянием только стадии лактации или только стадии стельности.

Для получения среднестадных характеристик удоев при любых значениях стадий лактации и стельности первостепенное значение имеет применение обоснованных уравнений, описывающих изменение удоев под влиянием этих двух детерминантов в отдельности и совместно, при исключении влияния всех остальных факторов.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в теоретическом обосновании применимости отдельных математических функций для описания изменения удоев под влиянием стадий лактации и стельности, а также определении степени соответствия теоретических и фактических величин удоев.

Материал и методы

При обосновании математических функций для описания изменений удоев разрабатывались динамические модели, основанные на физиологических процессах в организме животных.

Для проверки пригодности отдельных функций и их комплекса с целью описания изменения удоев использовались материалы племенного учета стада коров черно-пестрой породы ПНО «Пойма» Московской области. Всего обработано 2701 лактация 1138 коров с двумя лактациями и более. Выделено 5 групп лактаций (кроме первой) по продолжительности сервис-периода: до 59 дней, 60-99, 100-139, 140-179, 180-219 дней. В каждой группе выделено 12 подгрупп по календарному

месяцу отела. В этих подгруппах вычислены средние удои за все, кроме последней, тридцатидневки лактации. В качестве характеристик групп по удоям за тридцатидневки использовали средние геометрические из 12 значений подгрупп.

Для описания изменений удоев за тридцатидневки под влиянием стадии лактации использовали средневзвешенные значения удоев по всем группам за те тридцатидневки, которые приходились на стадии стельности менее 60-и дней. Удои за остальные тридцатидневки в пределах каждой группы использовались для описания изменения удоев под влиянием стадии стельности.

Результаты исследований

При обосновании вида функций, описывающих изменение удоев под влиянием только стадии лактации, исходили из следующего:

- железистые клетки вымени сразу после отела бурно пролиферируют, затем скорость этого процесса резко уменьшается и к середине лактации приближается к нулю [2];
- функциональная активность железистых клеток у нестельной коровы незначительно понижается не под влиянием гормонов, а вследствие старения или «устаивания»;
- на протяжении лактации железистые клетки разрушаются, причем долю сохранившихся клеток можно представить логарифмической функцией от стадии лактации [3].

Совместное влияние всех этих процессов выражали уравнением:

$$Y = vAx^{b/\exp kx}e^{-cx}, \quad (1)$$

где Y – величина удоя в момент x ; v – средняя функциональная активность клеток нестельной коровы через месяц после отела; A – характеристика числа клеток, начавших секретировать в период от отела до конца первого месяца лактации; x – стадия лактации – число отрезков времени (дней, недель, месяцев), прошедших от отела; b – параметр, характеризующий скорость пролиферации железистых клеток вымени; e – основание натуральных логарифмов; k – коэффициент, характеризующий влияние возраста коров на процесс пролиферации. Для первотелок он принят равным 1,8, для коров старшего возраста – 2,0; c – параметр, характеризующий скорость распада железистых клеток вымени коров.

Параметры этого уравнения, приведенные к логарифмическому виду, определяли методом наименьших квадратов. При этом использовали фактические значения удоев за тридцатидневки лактации у коров всего стада со стельностью менее трех месяцев, предполагая, что до этого момента влияние стельности на удои было незначительным.

При обосновании уравнения, описывающего изменение удоев со стадией стельности, предполагали, что под влиянием БАВ, образующихся в плаценте и поступающих в кровь матери (гормоны, медиаторы) изменяется функциональная активность железистых клеток вымени, а на число клеток этот фактор не влияет.

Предрасположенность железистых клеток вымени к блокировке под влиянием стельности считали функцией продолжительности беременности у крупного рогатого скота. До наступления стельности заблокированная доля функциональной активности (ЗФА) клеток составляет

$$W_0 = 1 - e^{-1/285}, \quad (2)$$

где W – ЗФА до наступления стельности; 285 – дни стельности.

В конце стельности ЗФА увеличивается до значения

$$W_f = 1 - e^{-1}, \quad (3)$$

где W_f – максимальное значение ЗФА.

Исходя из предположения, что стельность влияет на удои путем изменения доли ЗФА и путем стимулирования функциональной активности клеток вымени БАВ, выделяемыми плацентой [4], принимали, что изменение ЗФА регулируется ее ресурсом и ростом массы плода.

Под влиянием ресурса ЗФА удельный темп роста ЗФА уменьшается с течением времени, т.е.

$$dW/dz = kS, \quad (4)$$

где z – стадия стельности; k – постоянный коэффициент, характеризующий темпы увеличения ЗФА под влиянием ее ресурса; S – ресурс ЗФА, причем

$$S = W_f - W. \quad (5)$$

Под влиянием роста плода темпы увеличения ЗФА повышаются, т.е.

$$dW/dz = bW, \quad (6)$$

где b – коэффициент, характеризующий относительный темп роста ЗФА под влиянием увеличения массы плода.

В соответствии с уравнениями 4 и 6, справедливо предположение, что изменение ЗФА зависит от обоих факторов. Это выражается равенством

$$dW/dz = k^1WS, \quad (7)$$

k^1 – постоянная величина, причем ее можно представить так

$$k^1 = b/W_f \quad (8)$$

Подставляем в уравнение 7 значение S из уравнения 5 и k^1 из уравнения 8 и, после преобразования, получаем

$$dW/dz = bW(1 - W/W_f) \quad (9)$$

Интегрирование этого выражения дает

$$W = W_0W_f/(W_0 + (W_f - W_0))e^{-bz} \quad (10)$$

т.е. изменение ЗФА можно представить зависимостью от ресурса ЗФА и от роста массы плода.

При значениях W_0 и W_f , определенных равенством (2) и (3), уравнение (10) принимает вид

$$W = 0,6321206/(1 + 179,47182e^{-bz}) \quad (11)$$

Изменение функциональной активности железистых клеток вымени под влиянием БАВ плаценты можно аппроксимировать уравнением роста Гомпертца (5), приняв, что

$$dR/dt = \mu R, \quad (12)$$

где R – функциональная активность клеток вымени, обусловленная влиянием БАВ плаценты; μ – удельный темп роста функциональной активности, которая не является постоянным на протяжении стельности, а изменяется по закону

$$d\mu/dt = -D\mu, \quad (13)$$

где D – коэффициент, характеризующий уменьшение μ .

Формализация этих условий приводит, как показано в [5], к уравнению Гомперца, т.е.

$$R^1 = R_0^1 \exp(\mu_0(1 - e^{-Dt})/D), \quad (14)$$

где R_0^1 – функциональная активность клеток вымени нестельной коровы, обусловленная БАВ плаценты; μ_0 – значение параметра μ в момент, когда БАВ плаценты не выделяется.

Разделив левую и правую части уравнения (14) на R_0 , получим относительные значения коэффициента – относительно функциональной активности клеток нестельной коровы, т.е.

$$R = \exp(\mu_0(1 - e^{-Dt})/D), \quad (15)$$

где R – относительное значение функциональной активности железистых клеток вымени; t – момент от начала секреции БАВ плаценты.

Принимая во внимание, что функциональная активность секреторных клеток вымени блокируясь уменьшается с течением стельности и, в то же время, стимулируется БАВ плаценты, можно записать, что количество молока, секретируемое каждой клеткой, будет

$$Y_c = V(1 - W)R^1, \quad (16)$$

где V – максимальная функциональная активность клетки; Y_c – количество молока, секретируемого каждой железистой клеткой вымени стельной коровы.

В соответствии с уравнениями (1) и (16), количество молока, образующегося в вымени стельной коровы можно представить так

$$y_c = vAx^{b/\exp kx} e^{-cx} V(1 - W)R^1, \quad (17)$$

где Y_c – количество молока, образующегося в вымени стельной коровы на стадии стельности z и стадии лактации x .

Количество молока, образующегося в вымени нестельной коровы с учетом предположенности к блокировке функциональной активности, выражается уравнением

$$y_a = vAx^{b/\exp kx} e^{-cx} V(1 - W_0)R_0^1, \quad (18)$$

где $y_{я}$ – удои нестельной коровы на стадии лактации.

В соответствии с уравнениями (17) и (18), отношение удоя стельной коровы к удою нестельной выражается уравнением

$$y_c/y_{я} = R(1 - W)/(1 - W_o), \quad (19)$$

откуда

$$W = 1 - y_c(1 - W)/y_{я}R \quad (20)$$

В соответствии с уравнением (20), для вычисления эмпирических значений W – заблокированной доли функциональной активности секреторных клеток вымени, необходимо знание величин R – относительных значений стимулирующего влияния БАВ плаценты на функциональную активность клеток вымени, изменение которых с течением стельности описывается уравнением (15).

При определении параметров μ_o и D уравнения (15) исходили из того, что значение R с течением времени асимптотически приближается к своему максимуму, т.е. к $R_f = R_o \exp(\mu_o/D)$, а так как $R_o = 1$, то $\ln R_f = \mu_o/D$.

Подставим $\ln R_f$ вместо μ_o/D в уравнение (15) и получим

$$\ln R = \ln R_f(1 - \exp(-Dt)),$$

откуда

$$-D = \ln(1 - \ln R / \ln R_f) / t \quad (21)$$

Для определения величин параметра D делали два предположения: 1) БАВ плаценты начинает воздействовать на клетки вымени в возрасте плода более двух месяцев; 2) в конце стельности $R = 0,9999R_f$. Тогда уравнение (21) примет вид

$$-D = (\ln(1,001 * 10^{-4} / \ln R_f)) / 7,5, \quad (22)$$

а значение R вычисляется по формуле

$$R = \exp(\ln R_f(1 - e^{-D(z-2)})), \quad (23)$$

где для определения величины R_f используется положение о том, что в каждом классе по продолжительности сервис-периода величина параметра b уравнения (11) остается одинаковой при любом значении z – стадии стельности. При этом производятся следующие операции:

- выбирается величина R_f , несколько большая единицы;
- в каждом классе коров по продолжительности сервис – периода для каждого z вычисляются величины параметра b по формуле

$$b = (\ln((W_f - W)W_o) / ((W_f - W_o)W)) / z \quad (24)$$

Если в выбранном значении R_f ряд коэффициентов b с увеличением z уменьшается, то R_f необходимо увеличить, если увеличивается, то уменьшить.

Окончательная величина R_f принимается такой, при которой коэффициенты b при различных значениях z внутри класса по продолжительности сервис – периода становятся одинаковыми или колеблются неопределенно.

Используя таким путем определенное значение R_f для вычисления величин R , вычисляются значения W по формуле (20), которые используются для определения значений параметра b методом наименьших квадратов с использованием формулы (11).

Величины параметра b для групп коров с различной продолжительностью сервис – периода усредняются.

Теоретические значения удоев стельной коровы вычисляются по формуле

$$\hat{Y}_c = \hat{Y}_y \hat{R} (1 - \hat{W}) / (1 - W_0) \quad (25)$$

где \hat{Y}_c – удои стельной коровы на стадии стельности z и стадии лактации x ; \hat{Y}_y – теоретическое значение удоа нестельной коровы на стадии лактации x . Вычисляется по формуле (1); \hat{W} – теоретическое значение доли ЗФА, вычисленное по формуле (11). \hat{R} – теоретическое значение коэффициента, характеризующего увеличение функциональной активности клеток вымени стельной коровы в сравнении с нестельной. Вычисляется по формуле (23), в которой R_f определяется методом подбора, а параметр D вычисляется по формуле (22).

По материалам стада ПНО «Пойма» изменение удоев за тридцатидневки лактации среднестадной нестельной коровы под влиянием стадии лактации описано уравнением $y_{(x)} = 641,6x^{0,42403/\exp 2x} e^{-0,053279x}$, а стельной – под влиянием стадий лактации и стельности

$$y_{(x,z)} = y_{(x)} \exp(\ln 1,04(1 - \exp(-0,7961(z - 2)))(1,0035149 - 0,63434244/(1 + 179,47182e^{-0,83124z}))).$$

Теоретические и фактические значения удоев нестельной коровы представлены в таблице. Здесь же приведены значения удоев, вычисленных по формуле Вуда [3].

Из таблицы видно, что различия между величинами, вычисленными по формуле (1) и фактическими значениями не превышают 0,74%, они менее значительные и в большей степени носят случайный характер, чем различия между фактическими величинами и вычисленными по формуле Вуда. Сумма квадратов отклонений фактических значений от теоретических, вычисленных по формуле (1) составляет 35, а вычисленных по уравнению Вуда – 810, т.е. в первом случае различия статистически достоверно ($P < 0,0001$) меньше, чем во втором. Следовательно, предложенное нами уравнение (1) в большей степени пригодно для описания изменений удоев среднестадной нестельной коровы под влиянием только стадии лактации, чем уравнение Вуда.

Сравнение теоретических и средних фактических значений удоев коров с продолжительностью сервис-периода 60-99 дней (1021 лактация) представлено на рисунке. Здесь теоретические значения удоев при стадии лактации до 4,5 включительно описаны тем же уравнением, что и удои нестельной коровы, далее уравнением, описывающим изменение удоев под влиянием стадий лактации и стельности.

Таблица. Изменение удоев коров с течением лактации до наступления третьего месяца стельности (среднесезонные данные, 2-я лактация и более

Номер месяца лактации	Стадия лак- та- ции	Число лактаций	Фактиче- ский удой за тридца- тидневку, кг	Теоретические значения, кг		Разность, кг	
				по формуле Вуда	по форму- ле (1)	факт. - Вуд	факт. - (1)
1	0,	270	561	565	561	- 4	0
	5	1					
2	1,	270	596	583	597	+13	- 1
	5	1					
3	2,	270	566	566	563	0	+3
	5	1					
4	3,	270	532	539	533	- 7	- 1
	5	1					
5	4,	192	504	510	505	- 6	- 1
	5	9					
6	5,	908	476	479	479	- 3	- 3
	5						
7	6,	373	456	449	454	+ 7	+2
	5						

8	7, 5	373	431	420	430	+11	+1
9	8, 5	138	411	392	408	+19	+3

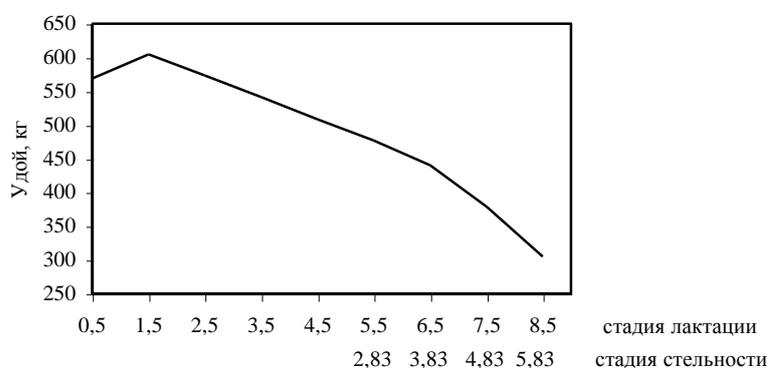


Рис. Лактационная кривая. Изменение удоев коров с течением лактации и стельности

Из рисунка видно, что теоретические и фактические значения хорошо совпадают на протяжении всей лактации. Максимальная разность до наступления третьего месяца стельности составляет 10 кг или 1,78%, а при стельности более двух месяцев 8 кг, или 2,55%.

Заключение

1. Изменение удоев молока коров в среднесезонных условиях под влиянием только стадии лактации аппроксимируется гамма-функцией с параметрами, характеризующими: а) относительное число клеток, начавших секретировать в период от отела до конца первого месяца лактации; б) интенсивность пролиферации железистых клеток вымени; в) скорость распада железистых клеток.

2. Интенсивность уменьшения удоев молока в среднесезонных условиях под влиянием стадии стельности описывается сложной экспоненциальной функцией, параметры которой характеризуют измене-

ние функциональной активности железистых клеток вымени под совместным седативным влиянием роста массы плода и БАВ плаценты.

3. Теоретические значения удоев за тридцатидневки, вычисленные по вышеприведенным математическим формулам, хорошо совпадают с фактическими удоями до наступления стельности (максимальная разница 1,8%) и в течение стельности (максимальная разница 2,5%).

4. Предложенные и использованные в настоящей работе математические функции и приемы обработки материала могут быть использованы при разработке корректировочных коэффициентов удоев на продолжительность сервис-периода с целью повышения точности оценки генотипов коров по молочной продуктивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Токарев Ю.Т. Методология изменений количественных признаков под влиянием временных средовых факторов и ее использование для повышения точности селекционной оценки животных: Дисс. ... д.с.-х.н., Калуга, 1997: 404.
2. Медведев И.К., Черепанов Г.Г., Хрусталева Г.И. Функциональная морфология молочной железы жвачных животных. Боровск, 2000, 293 с.
3. Wood P.D.P. A simple model of lactation curves for milk yield, food requirement and body weight. Animal production. J. of the British society of animal production. February, 1979, 28, 1. Longman. p. 55 – 63.
4. Hut F. W. und Schutzbar W. Zur frage des Laktationskurvensverlaufes beim Rind. Der Tierzuechter, 1981, 33, 7: 286-288.
5. Франс Дж., Торнли Дж.Х. М.: Математические модели в сельском хозяйстве. М, 1987, 400 с.

МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН В ОРГАНИЗМЕ МОЛОЧНЫХ КОРОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ПИТАНИЯ

В.И. Калашиник, С.Г. Кузнецов, В.Д. Омельченко
Лаборатория минерального питания

Установлена эффективность использования основных минеральных веществ при различных условиях питания молочных коров, получены данные по содержанию Ca, P, Mg, Na, K, S, Fe, Cu, Zn, Mn, J в артериальной и венозной крови, рубцовой жидкости, слюне, молоке, моче, кале, уточнены критерии обеспеченности организма макро- и

микроэлементами, разработана и испытана рецептура минерального премикса для коров.

Введение

Для совершенствования систем питания коров необходимы глубокие знания о различных аспектах обмена минеральных веществ. Известно, что определенная часть минеральных элементов в рубце жвачных животных связывается микроорганизмами, другая часть используется для поддержания ионного равновесия и других функций. Следовательно, физиологическая потребность коров в минеральных веществах складывается как из потребности их для макроорганизма, так и для жизнедеятельности микроорганизмов рубца. Этой проблеме были посвящены исследования трех предыдущих лет. В этом году мы изучали эффективность использования основных минеральных веществ при различных условиях кормления молочных коров, уточняли критерии обеспеченности организма макро- и микроэлементами, разработали и испытали рецептуру минерального премикса.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи был проведен в виварии института комплексный опыт на 8 лактирующих коровах-первотелках. У животных сонная артерия была выведена под кожу для получения артериальной крови. Первотелок холмогорской породы в начале второго месяца лактации разделили по принципу парных аналогов на две группы (контрольную и опытную) с учетом живой массы и продуктивности. Далее живую массу коров определяли в начале и конце каждого периода (предварительный и два опытных). Животных 1-й группы кормили согласно норм, изданных под редакцией А.П. Калашникова и др. (1994). Кормление коров 2-й группы (опытной) проводили по нормам, предлагаемым ВНИИФБиП. При этом использовали нормативы систем протеинового, энергетического и минерального питания, а также учитывали в рационе компоненты клетчатки – целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Витаминная часть премиксов обеих групп не отличалась. В опытный премикс П60-1Б были включены дополнительно Mg, S, Se, увеличена норма йода в 2,5 раза. В контрольном премиксе Fe, Mn, Zn, Cu, Co находились в форме сульфатов, йод – в форме йодида калия, а в опытном премиксе Zn и Mn были в форме оксидов, Co – в форме углекислой основной соли, йод – в форме йодата калия, Se – селенита натрия. Следовательно, в опытном премиксе Mn, Zn, Co и I присутствовали в форме более стабильных, усвояемых, технологичных и дешевых

источников. Данные по составу рационов, комбикормов и премиксов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Рационы дойных коров (по фактическому потреблению), состав комбикорма, рецептура премиксов

Ингредиенты	I период		II период	
	1-я гр.	2-я гр.	1-я гр.	2-я гр.
Сено разнотр.	1,97	1,61	2,69	1,29
Силос (овес+вика)	15,71	17,02	14,72	17,00
Свекла корм.	13,50	14,00	6,60	12,00
Комбикорм	7,0	6,00	7,80	6,60
Состав комбикорма, %				
Кукуруза	5	30		
Ячмень + овес	56	38		
Шрот соевый	5	23		
Жмых подсолнечный	30	5		
Трикальцийфосфат	1,5	1,5		
Соль поваренная	1,5	1,5		
Премикс П60-1А	1	–		
Премикс П60-1Б	–	1		
Состав премиксов (на 1т)				
	П60-1А	П60-1Б		
Витамин А, млн. МЕ	600	600		
Витамин Д, млн. МЕ	100	100		
Витамин Е, г	500	500		
Железо, г	300	300		
Медь, г	500	500		
Цинк, г	2000	2000		
Марганец, г	1000	1000		
Кобальт, г	100	100		
Йод, г	80	200		
Селен, г	–	20		
Магний, кг	–	20		
Сера, кг	–	10		
Сантохин, кг	0,5	0,5		

Рацион коров 1-й группы имел преимущества по деградируемости сырого протеина в рубце и содержал больше гемицеллюлозы и целлюлозы, полноценнее обеспечивал потребности в субстратах, микроэлементах, магнии и сере. Потребление энергии и сырой клетчатки в обеих группах было одинаковым (табл. 2).

Таблица 2. Фактическое потребление питательных веществ корма коровами в разные периоды опыта

Компоненты	Предварительный период	I период		II период	
		1-я гр.	2-я гр.	1-я гр.	2-я гр.
Сухое вещество, кг	16,1	16,4	15,9	15,5	16,4
Обменная энергия, МДж	147	148	148	144	153
Сырой протеин, г	2144	2031	2084	2041	2254
Сырая клетчатка, г	3099	3234	2809	2847	3066
Крахмал, г	2293	2077	2636	1876	2665
Сахар, г	1104	1552	1248	1206	877
Сырой жир, г	600	665	546	659	655
Кальций, г	106	96	86	101	88
Фосфор, г	65	80	70	82	73
Магний, г	39	29	23	29	24
Натрий, г	70	75	69	73	70
Калий, г	205	239	255	224	246
Сера, г	38	26	24	27	24
Железо, мг	280	2987	2563	3210	2500
Медь, мг	92	162	131	164	133
Цинк, мг	353	540	507	568	527
Марганец, мг	991	846	712	880	675
Кобальт, мг	10	11	11	12	11
Йод, мг	5,4	4,8	7,8	5,2	8,5
Селен, мг	1,5	2,4	3,5	2,7	3,8
Каротин, мг	241	266	217	236	241
Витамины:					
А, тыс. МЕ	—	42	36	47	40
Д, тыс. МЕ	8,4	9,4	8,6	10,5	9,1
Е, мг	512	523	512	542	516

Предварительный период продолжался 20 суток, I опытный период – 28, II – 34 суток. Во I периоде контрольная группа животных стала опытной, а опытная – контрольной. В конце каждого периода проводили балансовые опыты продолжительностью 5 суток каждый. Животных кормили в 8, 14 и 20 ч равными дачами рациона, доили 3 раза, поили вволю из автоматических поилок. Содержали коров на привязи. Удой учитывали ежедневно, а анализ молочного жира и белка – 1 раз в неделю. В предварительный период, а также перед и после каждого баланса у животных брали кровь из молочной вены и сонной артерии 2 раза в сутки – утром (до кормления) и через 3 ч после кормления с целью определения артериально-венозной разницы минеральных веществ. В это же время, но 3 раза в сутки (в 7, 11 и 16 ч) брали образцы слюны и содержимого рубца.

В образцах кормов, кала, мочи, молока, слюны, рубцовой жидкости и крови определяли концентрацию минеральных веществ. Результаты обработаны методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Достоверных различий в живой массе коров в ходе эксперимента не выявлено. Молочная продуктивность коров в ходе опыта варьировала в пределах 17,5-21,4 л/сут (табл. 3). В I периоде в опытной группе был постоянно выше удой на 1,9-2,9 л/сут (в среднем на 2,0 л/сут, $P < 0,05$) и жирность молока – на 0,1 мас.% по сравнению с контролем. Во II периоде, при смене условий кормления (животные опытной группы стали получать рацион контрольной группы, а контрольной группы – рацион опытной) удой коров выровнялся, а жирность молока опытной группы резко упала.

Таблица 3. Молочная продуктивность коров в различные периоды опыта

Группы	Предварительный период	I период	II период
		<i>Удой, л/сут</i>	
1-я	18,2±0,30	18,8±0,33	20,1±0,23
2-я	18,5±0,13	20,8±0,41*	20,0±0,20
		<i>Жирность молока, %</i>	
1-я		3,01±0,09	3,02±0,08
2-я		3,11±0,07	2,55±0,14*

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с 1-й группой

Минеральный состав плазмы крови коров приведен в табл. 4. Анализ данных таблицы показал, что четкой и выраженной динамики концентрации минеральных элементов в артериальной и венозной крови, взятой до кормления (и после доения) и через 4 ч после кормления, не отмечено. Тем не менее, концентрация меди как в артериальной, так и венозной крови в обоих периодах опыта была постоянно ниже после кормления животных. Содержание фосфора и цинка повышалось после кормления только в крови молочной вены, а уровень железа в ней в это время существенно снижался.

Артерио-венозная разница (АВР) концентрации минеральных элементов зависела как от времени взятия образцов крови, так и условий кормления животных. Однако значимость и достоверность АВР для отдельных элементов была выражена неодинаково. Так АВР кальция была положительной и значимой во всех 8 образцах крови, т.е. до и после кормления в обеих группах и обоих периодах эксперимента. Притекающая артериальная кровь богаче кальцием, чем оттекающая от молочной железы венозная кровь. В I периоде эта разница была больше до кормления, а во II – после кормления. Известно, что основное коли-

Таблица 4. Концентрация макроэлементов (мг/100мл) и микроэлементов (мкг/100мл) в плазме артериальной (А) и венозной (В) крови коров в разных условиях кормления

Элементы	Время взятия пробы, ч	I период опыта						II период опыта					
		1-я гр.			2-я гр.			1-я гр.			2-я гр.		
		А	В	А-В	А	В	А-В	А	В	А-В	А	В	А-В
Са	7	10,6±0,4	9,5±0,2*	+1,1	10,6±0,3	9,8±0,3	+0,8	10,7±0,2	10,3±0,1	+0,4	11,1±0,2	10,4±0,1*	+0,7
	12	10,4±0,7	9,8±0,2	+0,6	9,6±0,3	9,1±0,4	+0,5	10,7±0,1	9,9±0,2*	+0,8	10,7±0,2	9,8±0,2*	+0,9
Р	7	16,7±1,0	15,4±1,3	+1,3	16,9±0,5	15,8±1,2	+1,1	16,5±0,5	15,6±0,4	+0,9	15,8±0,3	15,9±0,4	-0,1
	12	16,0±0,8	16,0±1,2	0	17,3±0,3	16,0±1,0	+1,3	16,8±0,4	16,8±0,5	0	15,2±0,2	17,1±0,9*	-1,9
Mg	7	2,5±0,02	2,6±0,2	-0,1	2,4±0,1	2,5±0,1	-0,1	2,3±0,05	2,3±0,1	0	2,2±0,1	2,1±0,1	+0,1
	12	2,4±0,08	2,5±0,1	-0,1	2,5±0,1	2,4±0,05	+0,1	2,3±0,1	2,2±0,1	+0,1	2,3±0,1	2,2±0,04	+0,1
Na	7	194±5,1	198±4,2	-4	197±0,7	197±1,5	0	153±2,3	150±0,9	+3	152±2,8	150±0,6	+2
	12	208±3,4	179±9,9*	+29	198±1,1	196±4,6	+2	150±2,4	148±0,7	+2	149±0,2	151±1,5	-2
К	7	27,3±2,0	27,3±1,0	0	28,2±1,2	27,0±1,0	+1,2	26,7±1,1	24,2±0,4	+2,5	25,0±1,5	23,6±0,4	+1,4
	12	32,9±0,7	22,4±3,4*	+10,5	31,6±1,8	28,0±2,3	+3,6	24,4±1,0	22,8±0,7	+1,6	23,5±0,4	23,7±0,5	-0,2
S	7	237±8,8	243±5,6	-6	230±4,6	245±5,7*	-15	222±6,5	238±12	-16	222±9,2	230±17	-8
	12	2,78±4,0	253±8,8*	+25	262±6,9	275±2,3*	-13	217±12	239±4,5*	-22	211±12	226±13	-15
Cu	7	102±13	97±16	+5	100±7,7	93±5,2	+7	78±4,5	76±7,2	+2	81±5,5	84±4,7	-3
	12	89±14	91±10	-2	84±5,2	82±5,1	+2	77±3,2	75±4,5	+2	76±2,3	74±1,0	+2
Zn	7	141±12	110±2,0*	+31	104±5,0	96±2,8	+8	91±5,1	77±5,3*	+14	89±14	87±13	+2
	12	109±7,5	118±7,0	-9	120±17	106±8,6	+14	92±7,2	82±4,7	+10	89±10	97±8,6	-8
Fe	7	178±40	200±36	-22	200±16	223±10	-23	124±11	138±9	-14	124±31	130±13	-6
	12	176±54	152±43	+24	177±2,6	120±18*	+57	130±16	119±14	+11	139±12	128±10	+11

Примечание: * – разница статистически достоверна между артериальной и венозной кровью

чество кальция находится в молочной сыворотке и переходит в молоко из крови.

Основное количество серы связано с молочными белками. Динамика этого макроэлемента была противоположной динамике кальция. АВР серы в 7 образцах крови из 8 была отрицательной и в основном достоверной, причем после кормления АВР выражена сильнее, чем до кормления животных. Следовательно, оттекающая от молочной железы кровь значительно богаче серой, чем притекающая. По другим элементам (P, Mg, Na, K, Cu, Zn) четкой и устойчивой зависимости не обнаружено. АВР железа была отрицательной до кормления и положительной – после кормления, причем у сытых коров она была выражена более значимо, чем у голодных.

Коровы контрольной группы в оба периода эксперимента потребляли больше жирорастворимых витаминов и минеральных элементов (кроме J, Se, K), чем опытные, главным образом за счет большего количества комбикорма в их рационе (табл. 2). Однако существенной разницы в концентрации минеральных элементов в крови подопытных животных мы не обнаружили. Тем не менее, концентрация цинка в плазме крови коров 2-й группы была достоверно выше в оба периода, что связано, по-видимому, с лучшей усвояемостью элемента из кормов опытного рациона. Достоверная разница в пользу опытной группы обнаружена также по меди и фосфору, но только в первый период эксперимента.

В табл. 5 приведены данные по динамике фосфора и серы в рубцовой жидкости коров. Эти элементы играют важную роль в жизнедеятельности микрофлоры рубца. Достоверная разница по содержанию фосфора и серы в рубцовой жидкости между группами обнаружена только у коров до утреннего кормления. Далее эта разница сглаживалась. В отношении фосфора четкой зависимости концентрации элемента от времени взятия образцов рубцовой жидкости не выявлено. Однако содержание серы в ней после кормления животных значительно повышалось. В предыдущих опытах нами обнаружена положительная корреляционная зависимость между концентрацией серы в рубцовой жидкости коров и количеством в ней микробиального белка.

Содержание основных макроэлементов в слюне коров приведено в табл. 6. В предварительный период опыта концентрация P, K, Na в слюне коров была значительно ниже, а серы почти в 2 раза выше, чем в опытные периоды, что хорошо согласуется с уровнем их потребления. Не обнаружено достоверной зависимости концентрации P, Na, K, S в слюне коров как от условий кормления (1 и 2 группы), так и от времени взятия ее образцов (7, 11 и 16 ч).

Таблица 5. Динамика содержания фосфора и серы (мг/100мл) в рубцовой жидкости коров

Элемент	Время взятия пробы, час	I период		II период	
		1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
Фосфор	7	50,8±3,2	43,1±3,2*	43,6±1,3	44,2±0,9
	11	41,6±3,7	41,8±1,2	46,4±2,8	46,1±2,5
	16	46,0±1,7	42,2±2,7	47,2±3,2	51,1±1,3
Сера	7	23,4±1,6	31,0±2,2*	16,3±3,7	22,0±1,4*
	11	30,8±2,2	32,2±2,5	19,2±1,7	18,3±2,0
	16	35,4±2,3	38,0±1,3	23,0±4,8	24,5±0,3

Примечание: * – разница между группами статистически достоверна

Таблица 6. Содержание минеральных веществ в слюне (мг/100 мл)

Период	Группа	Фосфор	Натрий	Калий	Сера
Предварит.	1	25,0±2,3	160±3,2	44,5±7,2	53,7±7,4
	2	22,5±1,3	170±2,8	32,1±5,6	40,7±8,4
I	1	37,1±2,3	241±6,6	117±9,3	29,6±4,4
	2	32,2±1,4	227±12	94±9,2	25,6±2,5
II	1	45,5±3,8	266±2,5	168±6,8	23,2±1,5
	2	46,6±3,5	275±5,3	169±7,5	29,0±4,2

Минеральный состав молока коров при разных условиях кормления представлен в табл. 7. В I период эксперимента концентрация фосфора и натрия в молоке коров 1-й группы была достоверно ниже, а цинка и йода выше, чем в опытной группе. Во II период опыта такая закономерность сохранилась только в отношении йода. Следовательно, молоко хорошо отражает статус йода в организме дойных коров, что хорошо согласуется с данными литературы.

Концентрация кальция и йода в моче коров 2-й группы в оба периода опыта была значительно выше, чем в контроле ($P < 0,01$). По другим элементам заметной разницы не обнаружено, хотя в первом периоде опыта содержание P, K, S, Mg, Zn в моче контрольных животных было выше. После смены рационов картина в отношении этих элементов оказалась противоположной (табл. 8).

Баланс всех изученных минеральных элементов у коров, получавших одинаковый набор кормов, но различные их количества, был положительным (табл. 9). Величина ретенции Na, S, Cu коррелировала с уровнем потребления этих элементов, а отложение Ca, P, K, Mg, Zn, Mn, J в организме коров 2-й группы было выше, чем в контроле, несмотря на меньшее потребление их с кормом. Однако разница была достоверной только в отношении магния и йода. Эффективность усвое-

Таблица 7. Минеральный состав молока коров (на 100 мл)

Эле- мен-	I период		II период	
	1-я гр.	2-я гр.	1-я гр.	2-я гр.
Ca, мг	98,3±5,4	96,5±1,8	110±4,5	107±3,5
P, мг	89,3±1,1	83,8±1,2*	96,2±1,3	95,1±2,4
Na, мг	42,1±1,6	34,6±3,5*	48,7±4,0	47,5±3,1
K, мг	78,9±4,5	105±4,9*	150±13	155±10
S, мг	62,3±6,2	70,0±4,2	62,3±4,1	57,5±3,8
Mg, мг	13,5±0,7	13,0±1,0	12,5±0,5	12,9±0,9
Cu, мкг	88±5,6	119±18	128±17	137±15
Zn, мкг	463±29	551±17*	497±35	440±41
Fe, мкг	250±12	270±15	356±40	425±35
J, мкг	4,8±0,1	8,5±0,2*	6,7±0,3	9,1±0,2*
Mn, мкг	33±4,5	28±4,2	37±5,0	39±7,5

Примечание: * – разница между группами статистически достоверна

Таблица 8. Минеральный состав мочи коров при разных условиях кормления (на 100 мл)

Эле- менты	I период		II период	
	1-я группа	2-я группа	1-я группа	2-я группа
Ca, мг	0,56±0,06	0,92±0,18*	0,28±0,08	0,54±0,06*
P, мг	12,8±1,0	11,4±1,5	3,9±0,4	4,2±0,3
Na, мг	5,3±0,5	6,0±0,2	67,2±3,2	70,0±5,1
K, мг	300±14	269±25	249±12	273±4,6
S, мг	204±5,5	194±5,1	196±4,0	207±2,0*
Mg, мг	27,2±3,4	24,4±3,7	30,6±4,5	32,0±2,1
Cu, мкг	9,1±0,2	9,3±0,3	7,1±1,3	8,4±0,3
Zn, мкг	40,0±3,0	35,0±5,7	10,0±1,0	11,3±0,8
Fe, мкг	34,0±4,0	34,8±3,8	38,7±3,2	40,0±1,5

Примечание: * – разница между группами статистически достоверна

ния Ca, P, Mg, Cu, Zn, Mn, J была также выше в опытной группе. Очевидно, наряду с другими факторами, положительное влияние на использование минеральных веществ в организме коров оказал и опытный витаминно-минеральный премикс.

Таблица 9. Баланс минеральных веществ у коров (I период опыта)

Эле- мен- ты	Группы	Потреблено		Выделено, в сутки			Отложе- но, в сутки	Ус- воено, %
		в су- тки	на 1 кг СВК	с калом	с мочой	с мо- локом		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ca, г	1	97,7	6,4	54,3	0,92	21,9	21,0±7,7	44,4
	2	92,3	5,7	47,1	1,63	20,0	23,6±3,5	48,9
P, г	1	71,1	4,7	47,5	1,50	18,0	4,1±2,7	33,2

продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	2	66,1	4,1	38,7	1,54	20,1	5,8±1,2	41,5
Na, г	1	109,6	7,2	19,0	0,76	7,5	82,3±2,5	82,7
	2	103,2	6,4	19,2	0,64	4,3	79,1±5,5	81,4
K, г	1	286,1	18,7	36,2	37,3	15,3	197,3±12	87,4
	2	302,2	18,8	39,2	34,7	23,0	205,3±7,6	87,0
Mg, г	1	24,5	1,6	18,1	4,27	1,80	0,33±0,15	26,1
	2	22,6	1,4	13,6	4,02	2,01	2,97±0,57	39,8
S, г	1	49,5	3,2	20,6	12,0	13,4	3,5±0,7	58,4
	2	45,2	2,8	20,2	12,4	10,4	2,2±0,8	55,3
Cu, мг	1	178	11,6	99,9	13,1	34,5	30,5±5,2	43,9
	2	153	9,5	74,9	13,0	40,5	24,6±4,7	51,1
Zn, мг	1	538	35,2	373	4,0	20,4	139±15	30,6
	2	475	29,5	298	4,7	18,6	154±23	37,3
Mn, мг	1	810	52,3	660	0,8	0,7	149±15	18,5
	2	668	41,5	490	1,0	0,9	176±25	26,7
J, мг	1	4,35	0,28	1,6	0,77	0,76	1,22±0,14	63,2
	2	7,17	0,45	2,5	0,97	1,11	2,59±0,10	65,1

Выводы

1. Четкой и выраженной динамики концентрации минеральных элементов в артериальной и венозной крови, взятой до кормления и через 4 ч после кормления, не отмечено. Тем не менее, концентрация меди как в артериальной, так и венозной крови в обоих периодах опыта была постоянно ниже после кормления животных. Содержание фосфора и цинка повышалось после кормления только в крови молочной вены, а уровень железа в ней в это время существенно понижался.

2. Артерио-венозная разница (АВР) концентрации минеральных элементов зависела как от времени взятия образцов крови, так и условий кормления животных. Однако значимость и достоверность АВР для отдельных элементов была выражена неодинаково. Так, АВР кальция была положительной и существенной во всех 8 образцах крови, т.е. до и после кормления, в обеих группах и обоих периодах эксперимента. Притекающая артериальная кровь богаче кальцием, чем оттекающая от молочной железы венозная кровь.

3. Основное количество серы связано с молочными белками. Динамика серы была противоположной динамике кальция. АВР серы в 7 образцах крови из 8 была отрицательной и в основном достоверной, причем после кормления АВР выражена сильнее, чем до кормления животных. Следовательно, оттекающая от молочной железы кровь значительно богаче серой, чем притекающая. По другим элементам (P, Mg, Na, K, Cu, Zn) четкой и устойчивой зависимости не обнаружено. АВР железа была отрицательной до кормления и положительной – после кормления.

4. Существенной разницы в концентрации минеральных элементов в крови подопытных животных не обнаружено. Тем не менее, концентрация цинка в плазме крови коров 2-й группы была достоверно выше в оба периода, что связано, по-видимому, с лучшей усвояемостью элемента из кормов опытного рациона. Достоверная разница в пользу опытной группы обнаружена также по меди и фосфору, но только в первый период эксперимента.

5. Фосфор и сера играют важную роль в жизнедеятельности микрофлоры рубца. Достоверная разница по содержанию фосфора и серы в рубцовой жидкости (РЖ) между группами обнаружена только у коров до утреннего кормления. Далее эта разница сглаживалась. В отношении фосфора четкой зависимости концентрации элемента от времени взятия образцов РЖ не выявлено. Однако содержание серы в РЖ после кормления животных значительно повышалось.

6. В предварительный период опыта концентрация P, K, Na в слюне была значительно ниже, а серы почти в 2 раза выше, чем в опытные периоды, что хорошо согласуется с уровнем их потребления. Не обнаружено достоверной зависимости концентрации P, Na, K, S в слюне коров как от условий кормления (1 и 2 группы), так и от времени взятия ее образцов (7, 11 и 16 ч).

7. В первый период эксперимента концентрация фосфора и натрия в молоке коров 1-й группы была достоверно ниже, а цинка и йода выше, чем в опытной группе. Во второй период опыта такая закономерность сохранилась только в отношении йода. Следовательно, молоко хорошо отражает статус йода в организме дойных коров.

8. Концентрация кальция и йода в моче коров 2-й группы в оба периода опыта была значительно выше, чем в контроле. По другим элементам заметной разницы не обнаружено, хотя в первом периоде опыта содержание P, K, S, Mg, Zn в моче контрольных животных было выше. После смены рационов картина в отношении этих элементов оказалась противоположной.

9. Баланс всех изученных минеральных элементов у коров, получавших одинаковый набор кормов, но разные их количества, был положительным. Величина ретенции Na, S, Cu коррелировала с уровнем потребления этих элементов, а отложение Ca, P, K, Mg, Zn, Mn, J в организме коров 2-й группы было выше, чем в контроле, несмотря на меньшее потребление их с кормом. Однако разница была достоверной только в отношении магния и йода. Эффективность усвоения Ca, P, Mg, Cu, Zn, Mn, J была также выше в группе коров, рацион которых был сформулирован на основе разрабатываемой системы питания.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА У КОРОВ ПОСЛЕ ОТЕЛА И ТЕЛЯТ В ПЕРВЫЕ ДНИ ЖИЗНИ

В.А. Матвеев, Т.Н. Дворецкая

Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ и продуктивности с.-х. животных

Установлено, что развитие лактационной доминанты у коров происходит на фоне торможения функции инсулярного аппарата, снижения уровня тиреоидных гормонов и высокой активности коры надпочечников. Динамика концентрации кортизола и тироксина в молоке коров в первые дни после отела совпадает с динамикой этих гормонов в крови телят в этом возрастном периоде. В первые дни жизни у телят наблюдаются существенные изменения функциональной активности щитовидной железы, коры надпочечников и поджелудочной железы. Инсулярный аппарат у новорожденных телят функционирует как у взрослых животных и способен адекватно реагировать изменением концентрации инсулина на прием корма. Уровень кортизола, тироксина и трийодтиронина у новорожденных телят значительно превышает показатели, характерные для взрослых животных и в течение первых 10 дней жизни значительно снижается.

Введение

Наиболее критическими для молодняка сельскохозяйственных животных, в т.ч. и для телят, являются первые дни жизни, когда происходит становление основных физиологических функций организма (1). Новорожденные должны адаптироваться к факторам окружающей среды и к новым условиям питания. После рождения у животных изменяются источники обеспечения организма энергией – от преимущественно углеводного обеспечения во внутриутробный период до использования большего количества жира и относительно низкого уровня углеводов в молозивный период (2-5). Молозиво коров содержит не только различные питательные вещества, но и жизненно важные биологически активные вещества – иммуноглобулины, факторы роста, гормоны и цитокинины (6-10). Установление секреции с молоком стероидных, пептидных и белковых гормонов явилось важным открытием последних десятилетий. Употребление молозива оказывает многочисленные эффекты на обмен веществ и гормональный статус новорожденных (11). Пищевые и не пищевые компоненты молозива, поступающие в организм новорожденных телят, влияют на процессы синтеза белка (12) и изменяют активность гормонов соматотропиновой оси (13). Результаты опубликованных исследований явились обоснованием актуальности

данной проблемы и целесообразности проведения работ в этом направлении.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что в процессах адаптации, регуляции обмена веществ, формировании и реализации продуктивного потенциала у молодняка крупного рогатого скота существенная роль принадлежит инсулину, кортизолу и тиреоидным гормонам (14). Эти гормоны присутствуют не только в молозиве, но и в молоке коров на более поздних стадиях лактации (15). В целях дальнейшего познания роли гормонов молока в постнатальном развитии эндокринной системы у телят-молочников планировалось определить количество инсулина, кортизола и тиреоидных гормонов в молоке коров в период раздоя и установить возможные связи между концентрацией гормонов в плазме крови коров, содержанием их в молоке и уровнем гормонов в крови телят в молозивный период выращивания.

Материал и методы

Эксперимент проведен в виварии института на девяти коровах-первотелках холмогорской породы и на их потомстве. До отела и в течение двух месяцев после него животные находились в одинаковых условиях кормления и содержания. Рацион составляли с учетом существующих детализированных норм (16) и он включал сено злаково-бобовое, силос разнотравный, свеклу кормовую (после отела) и комбикорм. Доеение и кормление коров 3-разовое. Телят сразу после рождения обтирали соломой, взвешивали и помещали в индивидуальные клетки. В течение 10 дней они получали только материнское молоко. Первую порцию молозива (1 литр) телятам выпаивали через час после рождения. В дальнейшем они получали по 2 литра молозива 3 раза в сутки.

Для оценки функционального состояния эндокринной системы у коров брали пробы крови и молока до отела и в период раздоя, а у телят – пробы крови в 1-, 3-, 5- и 10-й дни после рождения. Кровь брали до кормления и через 1 и 3 часа после приема корма. В пробах цельной крови определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом (17), а в плазме крови и в цельном молоке – содержание инсулина, тироксина, трийодтиронина и кортизола радиоиммунологическим или иммуноферментным методами (18). Полученные результаты были обработаны с использованием стандартных методов биометрии (19).

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что в первые дни после отела концентрация инсулина в плазме крови значительно ниже по сравнению с сухостойным периодом (табл. 1). В этот период уровень гор-

мона в крови существенно не изменяется после приема корма, что свидетельствует о торможении функции инсулярного аппарата поджелудочной железы в этот период продуктивного цикла.

Таблица 1. Концентрация инсулина в плазме крови коров, нг\мл

Стадия репродуктивного цикла	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
Сухостойный период, 30 дней до отела	539±64	599±58	539±55
2-й день после отела	224±39	229±42	220±34
5-й день после отела	261±21	300±15	251±28
55-й день после отела	160±11	–	–

Можно предположить, что в результате торможения секреции инсулина у коров после отела изменяется интенсивность и направленность метаболических потоков. Усиливается распад липидов в жировых депо и катаболизм мышечных белков, что способствует оптимальному обеспечению процессов биосинтеза компонентов молока аминокислотами и жирными кислотами за счет мобилизации их из тканей.

В первые дни после отела в крови коров снижается уровень глюкозы, что указывает на недостаточную активность процессов глюконеогенеза на фоне резкого увеличения потребности в глюкозе для обеспечения процессов молокообразования. Но по сравнению с сухостойным периодом в плазме крови лактирующих животных существенно возрастает концентрация НЭЖК до утреннего кормления (табл. 2). Это свидетельствует об изменении соотношения между интенсивностью процессов липолиза и липогенеза в жировой ткани в сторону усиления распада депонированных липидов. В результате этого усиливает-

Таблица 2. Концентрация глюкозы в крови (мг %) и НЭЖК (мкмоль/л)

Стадия репродуктивного цикла	Время после приема корма, часы					
	0		1		3	
	глюкоза	НЭЖК	глюкоза	НЭЖК	глюкоза	НЭЖК
Сухост. период, 30 дн. до отела	47,2±0,7	153±21	47,0±0,9	148±26	45,2±1,1	350±31
2-й день после отела	43,8±2,7	282±74	46,0±2,4	171±35	47,2±2,5	187±60
5-й день после отела	39,7±3,7	319±113	41,1±4,6	157±36	42,2±3,7	150±18
55-й день после отела	50,9±1,4	682±64	–	–	–	–

ся поток неэтерифицированных жирных кислот из клеток жировой ткани в кровь, что способствует обеспечению процессов метаболизма этими субстратами в период значительно возросшей потребности в них организма лактирующих коров. На этой стадии лактации неэтерифицированные жирные кислоты являются основным источником энергии в организме коров.

Наряду с торможением функции инсулярного аппарата поджелудочной железы, после отела у коров наблюдались изменения и в активности других эндокринных желез. В первые дни после отела в плазме крови значительно ниже была концентрация тироксина и трийодтиронина (табл. 3). По-видимому, эти изменения связаны с участием тиреоидных гормонов в формировании у животных лактационной доминанты. Снижение уровня тиреоидных гормонов в крови коров на этой стадии лактации, вероятно, является результатом повышенного использования их тканями организма животных.

Таблица 3. Концентрация тироксина и трийодтиронина в плазме крови коров, нг/мл

Стадия репродуктивного цикла	Время после приема корма, часы					
	0		1		3	
	тироксин	трийодтиронин	тироксин	трийодтиронин	тироксин	трийодтиронин
Сухост. период, 30 дн. до отела	38,7±2,02	1,28 ± 0,07	42,9±3,39	1,38 ± 0,05	41,3±4,17	1,37 ± 0,06
2-й день после отела	27,4±1,99	0,97 ± 0,10	27,8±2,7	0,98 ± 0,08	26,0±1,93	1,07 ± 0,08
5-й день после отела	24,7±4,66	0,84 ± 0,16	28,4±5,73	0,94 ± 0,19	28,7±4,72	1,04 ± 0,21

Эндокринная система играет существенную роль в подготовке животных к отелу и в дальнейшем развитии этого процесса. Установлено, что перед отелом существенно увеличивается секреция глюкокортикоидов, которые участвуют в регуляции родов. Это согласуется с результатами наших исследований, так как высокая концентрация кортизола в плазме крови коров сохранялась еще и на 2-й день после отела (табл. 4). В последующем уровень гормона снижался.

Таблица 4. Концентрация кортизола в плазме крови коров, нг/мл

Стадия репродуктивного цикла	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
Сухостойный период, 30 дней до отела	11,0±1,73	6,5 ± 1,73	10,3±2,0

2-й день после отела	19,6±3,72	9,4 ± 1,11	16,5±3,41
5-й день после отела	7,3 ± 1,16	5,8 ± 0,82	4,0 ± 1,00

Данные по концентрации гормонов в плазме крови телят приведены в табл. 5. Достоверной разницы между базальным уровнем инсулина в разные периоды взятия проб крови у телят выявлено не было, однако на 3-и и 5-е сутки жизни проявлялась тенденция к увеличению исходной концентрации гормона поджелудочной железы в крови (соответственно, на 24 % и 33 %) по сравнению с первым днем жизни.

Таблица 5. Концентрация инсулина, тироксина, трийодтиронина, кортизола и глюкозы в крови телят

Возраст, дни	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
	Инсулин, пг/мл		
1	573±179	801±200	555±156
3	709±53,2	1204±22,2	940±26,1
5	762±71	1066±129	955±149
10	391±29	923±47,6	668±49,8
	Тироксин, нг/мл		
1	103,5±6,7	103,7±3,6	107,7±3,9
3	64,4±6,3	65,6±4,8	64,6±5,4
5	52,9±2,9	54,6±3,2	53,0±2,9
10	55,4±2,6	59,4±2,7	60,5±3,1
	Трийодтиронин, нг/мл		
1	4,6±0,28	5,2±0,41	5,3±0,41
3	3,3±0,33	3,8±0,26	3,9±0,26
5	2,7±0,08	2,9±0,13	2,7±0,10
10	2,7±0,15	3,0±0,13	2,8±0,10
	Кортизол, нг/мл		
1	98,1±14,1	66,5±9,80	39,6±5,50
3	41,2±9,50	29,2±5,40	26,6±6,30
5	33,6±6,40	13,1±2,50	21,0±6,00
10	14,5±4,7	11,8±2,9	9,4±3,3
33	1,9±0,6	1,1±0,3	1,0±0,25
	Глюкоза, мг %		
1	98,5±12,0	106,2±14,0	117,8±18,0
3	125,6±4,1	139,5±6,6	143,3±10,0
5	121,7±3,7	137,7±7,7	132,0±5,2
10	113,8±3,4	143,0±4,3	122,4±3,8
33	66,5±3,6	98,2±6,0	86,6±2,9

Уровень инсулина в крови телят значительно превышал средние физиологические концентрации инсулина, которые свойственны коровам в первый период лактации, что свидетельствует о высокой активности инсулярного аппарата у них. Это согласуется с данными литера-

туры о том, что у новорожденных телят в 1 г ткани поджелудочной железы содержится на 50 % больше инсулина, чем у половозрелого крупного рогатого скота (20).

Уже в первый день жизни телят инсулярный аппарат поджелудочной железы реагировал на прием молозива увеличением в крови уровня инсулина. В последующем реакция инсулярного аппарата на прием корма усиливалась и на 10-е сутки жизни уровень инсулина в крови в ответ на прием корма увеличился на 136 % ($P < 0,01$). Через 3 часа после приема корма концентрация гормона снизилась, но не падала ниже базального уровня. Аналогичная реакция инсулярного аппарата характерна для молодняка крупного рогатого скота более старшего возраста (21), что свидетельствует о функциональной зрелости инсулярного аппарата у новорожденных телят.

В отличие от взрослых жвачных у телят в молозивный период развития наблюдалась более высокая концентрация глюкозы в крови (табл. 5). На 33-й день жизни содержание глюкозы в крови телят достоверно снизилось, но сохранялось достоверное увеличение ее уровня после приема молока. Следовательно, к этому возрасту не произошло становление рубцового пищеварения и после переваривания лактозы молока из желудочно-кишечного тракта в кровь всасывались углеводы, а не летучие жирные кислоты, как у взрослых жвачных животных.

Не установлено достоверной связи между концентрацией в крови глюкозы и инсулина. Данный факт свидетельствует о том, что у телят-молочников, как и у взрослых жвачных животных, в обычных физиологических ситуациях глюкоза не играет существенной роли в регуляции поступления инсулина из β -клеток поджелудочной железы.

Самая высокая концентрация кортизола, тироксина и трийодтиронина наблюдалась в крови новорожденных телят (табл. 5). На 3-й день содержание этих гормонов существенно снизилось. В последующем уровень тиреоидных гормонов изменялся незначительно, а концентрация кортизола продолжала существенно снижаться до 33-дневного возраста. По-видимому, эти изменения в гормональном статусе телят можно объяснить тем, что перед отелом в крови коров существенно возрастает содержание кортизола и тиреоидных гормонов. Эти гормоны могут проходить через плацентарный барьер и поступать в кровь плода. После отела уровень гормонов в крови телят поддерживается за счет функционирования собственных эндокринных желез. Поэтому в первые 3 дня жизни гормоны матери метаболизируются в организме теленка и содержание их в крови резко падает. В дальнейшем, по мере адаптации организма животного к новым условиям, уровень их изменяется менее значительно.

Результаты определения содержания гормонов в молоке показали, что с молоком выделяются не только стероидные, но и в значительном количестве белковые гормоны. Концентрация инсулина в молоке

коров в течение первых 2-х дней лактации была на порядок выше его содержания в крови (табл. 6). В дальнейшем концентрация инсулина в молоке снизилась и приблизилась к уровню гормона в плазме крови.

Таблица 6. Концентрация инсулина, кортизола и тироксина в цельном молоке коров, пг/мл

Гормоны	Дни лактации					
	1	2	3	5	10	55
Инсулин, пг/мл	2863±312	1915±279	271±61	407±122	263±60	211±45
Кортизол, нг/мл	12,0±0,7	8,6±0,3	5,6±0,3	4,9±0,4	2,9±0,4	–
Тироксин, нг/мл	118±6,8	59,1±1,0	51,6±3,8	46,0±3,0	40,0±2,8	–

До настоящего времени в доступной литературе мы не обнаружили информации о механизмах, обеспечивающих поступление белковых гормонов из крови в молоко. По-видимому, в транспорте инсулина из крови в секреторные клетки молочной железы и из них в молоко участвуют механизмы, в определенной мере аналогичные транспорту иммуноглобулинов из крови в молоко. Такое предположение базируется на факте, что в первые дни после отела в молозиве обнаруживается высокое содержание иммуноглобулинов, а в дальнейшем уровень их снижается.

В первый день лактации не установлено достоверной корреляции между концентрацией гормона в крови и его содержанием в молоке. На 2-й день лактации установлена положительная корреляция между содержанием инсулина в плазме крови и его уровнем в молоке. Коэффициент корреляции до приема корма и через 1 и 3 часа после него составил +0,81 ($P < 0,05$), +0,87 ($P < 0,01$) и +0,32 ($P > 0,05$) соответственно. Аналогичная зависимость подтвердилась и на 5-й день лактации через 1 и 3 часа после приема корма ($r = +0,99$; $P < 0,01$). Следовательно, начиная со 2-го дня лактации по концентрации инсулина в молоке коров можно судить об уровне гормона в крови животного.

Концентрация кортизола и тироксина в молоке коров (табл. 6) изменялась аналогично содержанию этих гормонов в крови телят (табл. 5) – уровень кортизола существенно снижался на протяжении 10 дней, а концентрация тироксина достоверно снижалась только на 2-й день лактации, а в последующем уменьшалась незначительно.

В среднем по группе животных установлена положительная корреляция между содержанием в молоке коров и крови телят кортизола ($r = +0,9997$; $P < 0,01$) и тироксина ($r = +0,989$; $P < 0,01$). Эти данные свидетельствуют, что в течение первых 10 дней жизни у телят в формировании гормонального статуса и, соответственно, в регуляции обмена веществ могут существенную роль играть гормоны, которые

образуются в организме матери и поступают с молоком в организм теленка.

Данная работа является начальным этапом исследований роли гормонов молока в реализации механизмов гормональной регуляции в организме растущих животных. Для развития этих исследований необходимы специальные методические подходы и, в том числе, исследования на оперированных животных. На данном этапе работы нам не удалось зарегистрировать увеличения концентрации кортизола и тиреоидных гормонов в крови телят после выпаивания им 2 литров молозива (табл. 5). Возможно, скорость поступления гормона из желудочно-кишечного тракта в кровь теленка уравнивается такой же скоростью связывания его в клетках органов и тканей. Кровь, оттекающая от желудочно-кишечного тракта, поступает в печень и не исключено, что значительная доля гормонов на этом этапе связывается клетками печени. Поэтому нам не удалось зарегистрировать увеличения уровня гормона в периферической крови после скармливания молока. Гормоны молока могут участвовать в становлении регуляторных систем и оказывать влияние на обмен веществ путем воздействия на эндокринные клетки в стенке желудочно-кишечного тракта и, в результате этого, проявлять биологический эффект даже не поступая в общий кровоток организма теленка. Для решения этих вопросов необходимы дальнейшие исследования.

Выводы

1. Развитие лактационной доминанты у коров происходит на фоне торможения функции инсулярного аппарата, снижения уровня тиреоидных гормонов и высокой активности коры надпочечников.

2. Молозиво у коров содержит в значительном количестве инсулин, тироксин и кортизол, которые, поступая в организм теленка, по видимому, участвуют в регуляции обмена веществ и становлении функции эндокринных желез, так как концентрация кортизола и тироксина в молоке коров в первые дни после отела достоверно положительно коррелирует с содержанием этих гормонов в крови телят в этот возрастной период.

3. Адаптация организма телят после рождения происходит на фоне существенных изменений в функциональной активности щитовидной железы, коры надпочечников и поджелудочной железы, что сопровождается изменением в крови концентрации инсулина, тироксина, трийодтиронина и кортизола.

4. Инсулярный аппарат у новорожденных телят функционирует как у взрослых животных, так как способен адекватно реагировать изменением концентрации инсулина на прием корма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шамберев Ю.Н., Эпштейн Н.А., Эдель К.Е. Естественная резистентность и гормональный профиль у телят раннего возраста при пероральном введении стероидных препаратов. Известия ТСХА, 1987, 1.
2. Aynsley-Green A. Metabolic and endocrine interrelationships in the human fetus and neonate: an overview of the control of the adaptation to postnatal nutrition. In: Perinatal Nutrition (Lindblad, B.S., ed.). Academic Press, New York. 1988: 161-191.
3. Ferre P., Decaux J.-F., Issad T. & Girard J. (1986) Changes in energy metabolism during suckling and weaning period in the newborn. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1986, 26: 619-631.
4. Girard J. Gluconeogenesis in late fetal and early neonatal life. *Biol. Neonate*, 1986, 50: 237-258.
5. Odle J. New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model. *J. Nutr.*, 1997, 127: 1061-1067.
6. Campana W.M. and Baumrucker C.R. Hormones and growth factors in bovine milk. In: *Handbook of Milk Composition* (Jensen R.G., ed.). Academic Press, New York. 1995: 476-494.
7. Grosvenor C.E., Picciano M.F. & Baumrucker C.R. Hormones and growth factors in milk. *Endocr. Rev.*, 1993, 14: 710-728.
8. Koldovsky O. Search for a role of milk-borne biologically active peptides for the suckling. *J. Nutr.*, 1989, 119: 1543-1551.
9. Roy J.H.B. Factors affecting susceptibility of calves to disease. *J. Dairy Sci.*, 1980, 63: 650-664.
10. Stott G.H. and Fella A. Colostral immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves. *J. Dairy Sci.*, 1983, 66: 1319-1328.
11. Алиев М.Г., Рагимова Ш.А., Исмаилов Ю.Б. Новая веха в изучении физиологии лактации человека и животных. Баку, ЭЛМ. 1990: 92.
12. Burrin D.G., Davis T.A., Ebner S., Schoknecht P.A., Fiorotto M.L., Reeds P.J. and McAvoy S. Nutrient-independent and nutrient-dependent factors stimulate protein synthesis in colostrum-fed newborn pigs. *Pediatr. Res.*, 1995, 37: 593-599.
13. Hammon H. and Blum J.W. The somatotrophic axis in neonatal calves can be modulated by nutrition, growth hormone and Long-R³-IGF-1. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273: 130-138.
14. Радченков В.П., Матвеев В.А., Бутров Е.В, Буркова Е.И. Эндокринная регуляция роста и продуктивности сельскохозяйственных животных. М.: Агропромиздат. 1991: 160.
15. Матвеев В.А., Дюкар А.И. Состояние эндокринной системы коров с разным уровнем молочной продуктивности. Бюллетень ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск. 1992, 2-3(103-104): 26-30.

16. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. Под ред. А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова, В.Н. Баканова и др. М.: Агропромиздат, 1985: 352.
17. Радченков В.П., Матвеев В.А., Аверин В.С. и др. Определение потенциала функции инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота. Методические указания. Боровск, 1986: 9.
18. Радченков В.П. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. Методические указания. Боровск, 1985.
19. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учеб. пособие для биологич. спец. вузов. М.: Высш. школа, 1980. 293 с.
20. Лысов В.Ф. Гормональный статус сельскохозяйственных животных. Казань: Казанск. вет. институт, 1982, 83 с.
21. Матвеев В.А., Радченков В.П., Бутров Е.В. Эндокринная регуляция метаболизма и продуктивности с.-х. животных. Биологические основы высокой продуктивности с.-х. животных. Материалы межд. конференции. Боровск, 1991: 3-12.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА РЕГУЛЯЦИИ ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У КОРОВ ПОСЛЕ ОТЕЛА

К.И. Бахитов

Лаборатория клеточной инженерии и трансплантации эмбрионов

Приведены результаты научно-производственного опыта по изучению эффективности усовершенствованной схемы гормональной стимуляции бесплодных коров в послеотельный период. Дополнительное введение 5-10 мг масляного раствора эстрадиола-валерианата, через 1-2 суток после окончания традиционной гормональной обработки прогестагеном и сывороточным гонадотропином, обеспечило возобновление циклической активности яичников и усиление внешних признаков охоты у 91-93,3% нециклирующих после отела коров, четкую (в течение 1-2 суток) синхронизацию и некоторое (на 0,8-10,1%) повышение оплодотворяемости коров в первую (синхронизированную) охоту. Внедрение разработки проведено на двух молочных комплексах ГПЗ «Ворсино».

Введение

Основной задачей в работе по организации воспроизводства стада крупного рогатого скота является ежегодное получение приплода от каждой коровы. В решении этой задачи существует ряд объективных

и субъективных проблем. Теоретически функциональная деятельность яичников при оптимальных условиях возобновляется через 14-15 дней, а первая овуляция в них происходит на 17-28-й дни после отела коровы. Однако в обычных хозяйственных условиях в указанные сроки овуляция отмечается примерно у 48% животных, причем в большинстве случаев (79%) без внешнего проявления признаков охоты, что усложняет контроль за физиологическим состоянием репродуктивной системы коров в первый месяц лактации. Следует отметить, что желтое тело, образовавшееся в яичнике коровы после первой овуляции не получает нормального развития и регрессирует раньше обычного срока, поэтому этот цикл, как правило, является укороченным (1, 7). Тем не менее, первая овуляция, являясь своего рода пусковым механизмом циклических эстральных процессов, может служить критерием оценки физиологического состояния репродуктивной системы коров в этот период. Ряд исследователей (8, 9) считают, что увеличение числа зафиксированных овуляторных циклов, предшествующих осеменению, благоприятно отражается на оплодотворяемости коров. Однако выявление этих циклов затрудняется отсутствием или слабым проявлением внешних признаков охоты при овуляциях (5, 6). Поэтому на практике при организации работы по воспроизводству на молочных комплексах требуется через 5-6 недель после отела исследовать функциональное состояние репродуктивных органов у каждой нециклирующей коровы для постановки диагноза и назначения схемы гормональной их стимуляции. Чаще всего при этом регистрируют гипофункциональное состояние яичников, либо наличие в них слаборазвитых желтых тел и, значительно реже, прочие нарушения. По основным формам бесплодия имеются отработанные схемы лечения, эффективность которых в значительной степени зависит от состояния животного и качества используемых препаратов. К примеру, предполагаемое по схеме лечения гипофункции яичников коров 6-8-кратное введение прогестагенов с последующей инъекцией ГСЖК на 15-30% снижает оплодотворяемость животных в синхронизированную охоту (1). Для повышения эффекта стимуляции бесплодных коров рекомендуется сочетать эту обработку с инъекцией эстрогенов.

Известно (3), что в нормальных условиях количество эстрогенов в крови у коров начинает увеличиваться после регрессии желтого тела и падения концентрации прогестерона, достигая максимума примерно за 2-3 дня до овуляции. Причем роль эстрогенов (в частности эстрадиола) не ограничивается вызыванием морфологических изменений в половых путях коров в период, предшествующий охоте и овуляции. Эстрогены также стимулируют увеличение секреции слизи из влагалища, способствуют повышению двигательной активности коров, усиливая внешнее проявление признаков охоты. Увеличение концентрации эстрогенов в крови у коров при низком уровне прогестерона

стимулирует своевременность выброса ЛГ из гипофиза и, тем самым, управляет сроком овуляции (2, 3). Следовательно, на данном этапе цикла эстроген является основным стимулирующим фактором.

Учитывая вышеизложенное, задачей настоящего исследования было определение эффективности инъекции эстрогена как дополнительного фактора схемы лечения указанных выше форм бесплодия скота. Предпринимали это с целью усиления проявления внешних признаков охоты, повышения синхронности проявления охоты и для уменьшения вредного влияния гестагенов на оплодотворяемость коров в синхронизированную охоту.

Материал и методы

Исследования проводили на коровах черно-пестрой породы в ГПЗ «Ворсино» Калужской области в ранне-весенний период их стойлового содержания. Для опыта были подобраны 3 группы коров, не осемененных через 36-42 дня после отела. При исследовании репродуктивных органов у большинства коров (около 70%) было установлено гипофункциональное состояние яичников, у остальных – слаборазвитые желтые тела. Для стимуляции циклической активности яичников была использована традиционная схема: трехкратная (с интервалом 1 день) инъекция масляного раствора прогестерона в дозе 100 мг (либо однократная инъекция амола в дозе 200 мг) с последующим (через 1 день) введением 1000 м.е. сывороточного гонадотропина (ГСЖК).

Схемы гормональной стимуляции бесплодных коров

Группы	Кол-во коров	Сроки введения препаратов (дни после отела)					
		прогестерон по 100 мг/гол			амол, 200 мг	ГСЖК 1000 м.е.	эстрадиол 5-10 мг
1	34	36-й	38-й	40-й	–	42-й	–
2	30	36-й	38-й	40-й	–	42-й	43-44-й
3	22	–	–	–	36-й	44-й	45-46-й

Коровам 2 и 3-й групп, не пришедшим в охоту через 24 часа после инъекции им сывороточного гонадотропина, вводили от 5 до 10 мг эстрадиола-валерианата. По результатам опыта учитывали количество коров, осемененных в течение 10 дней после окончания гормональной стимуляции, и оплодотворяемость их через 2 месяца после последнего осеменения (путем ректального определения стельности).

Производственное испытание усовершенствованной схемы стимуляции нециклирующих после отела коров проводили на двух молочных комплексах ГПЗ «Ворсино» с учетом тех же показателей воспроизводства, что и в опытный период.

Результаты и обсуждение

Как показали исследования, в 1 (контрольной) группе коров в течение 10 дней после окончания обработки были осеменены 61,8% животных (табл. 1). При этом лишь примерно 30% из них проявили охоту через 24-48 часов после инъекции им ГСЖК, остальные были осеменены через 4-10 дней после окончания стимуляции.

Таблица 1. Эффективность гормональной стимуляции бесплодных коров после отела

Группы	Кол-во коров	Из них осеменены за 10 дней		Оказались стельными			
				всего		по 1 осеменению	
		голов	%	голов	%	голов	%
1	34	21	61,8	17	50,0	9	26,5
2	30	28	93,3	25	83,3	11	36,6
3	22	20	91,0	13	60,0	6	27,3

Следует отметить, что у 7 из 34 коров этой группы (20%) явного проявления признаков охоты не установлено и они были осеменены «по течке». Оплодотворяемость коров 1-й группы оказалась значительно ниже ожидаемой, особенно после первого осеменения (26,5%).

Дополнительное включение в схему гормональной обработки нециклирующих после отела коров инъекции 5-10 мг эстрадиола-валерианата, после введения гестанов и сывороточного гонадотропина, обеспечило синхронное проявление охоты у 91-93,3% из числа обработанных коров через 1 сутки после заключительной инъекции. Оплодотворяемость коров во 2 и 3-й группах была на 10-33,3% выше, чем в контрольной, в том числе по первому осеменению – на 0,8-10,1%. Некоторое снижение оплодотворяемости в синхронизированную охоту в 3-й опытной группе коров, обработанных амолом, вероятно, объясняется более продолжительным воздействием амола (гестагена пролонгированного действия) на организм коровы. Тем не менее, использованные схемы гормональной стимуляции бесплодных коров с помощью инъекции гестагенов в сочетании с сывороточным гонадотропином и последующим введением эстрадиола-валерианата обеспечили возобновление циклической деятельности яичников, явное проявление охоты почти у всех обработанных животных, четкую синхронизацию охоты и некоторое увеличение оплодотворяемости коров в синхронизированную охоту.

Производственное испытание рекомендуемой схемы гормональной стимуляции бесплодных коров проводили в течение 1998 года на двух молочных комплексах ГПЗ «Ворсино» путем фронтальной обработки всех коров в период между 6-8-й неделями после их отела (без предварительной диагностики состояния их репродуктивных органов). Гормональные препараты вводили нециклирующим коровам в тех же дозах и с такими же интервалами, что и в период эксперимента. При этом у некоторых коров (5-6%) после стимуляции была выявлена скрытая форма эндометрита, требующая специального лечения антибиотиками, поэтому такие животные из последующих расчетов были исключены. Точно также не были включены в расчеты по опытным группам отдельные коровы, которые по тем или иным причинам пришли в охоту раньше ожидаемого срока, то есть в период обработки. Результаты испытания представлены в таблице 2.

Как видно из данных таблицы 2, включение в схему стимуляции бесплодных коров дополнительной обработки эстрадиолом-валеринатом позволило в течение 1-2 суток осеменить 84,3-86,4% из числа обработанных коров. В процессе внедрения метода примерно 20-25% опытных коров инъекцию эстрадиола проводили через 24 часа, остальным через 43 часов после введения сывороточного гонадотропина. При этом заметной разницы в показателях по этим подгруппам не было установлено, поэтому в расчетах они были объединены в одну группу. Следует отметить, что за весь период внедрения метода были выявлены коровы со скрытой формой эндометрита и начато своевременное их лечение антибиотическими препаратами типа левозитроциклина, что позволило начать стимуляцию охоты в следующем цикле. Оплодотворяемость коров опытных групп в течение 2-3 циклов после окончания стимуляции оказалась на 12,3-18,2% выше, чем в контрольной группе.

Таблица 2. Результаты стимуляции и синхронизации охоты у нециклирующих коров после отела

Группы	Кол-во коров, голов	Из них осеменены в течение 10 дней		Оказались стельными в течение 2-3 циклов	
		голов	%	голов	%
1-я контроль (прогестерон + ГСЖК)	79	51	64,6	41	52,0
2-я опытная (прог.+ГСЖК+ЭВ)	280	242	86,4	202	70,2
3-я опытная (амол+ГСЖК+ЭВ)	70	59	84,3	45	64,3

Таким образом, результаты эксперимента и последующего производственного испытания усовершенствованной схемы стимуляции

бесплодных коров после отела показали благоприятное влияние дополнительной инъекции эстрадиола-валерианата после сывороточного гонадотропина. Инъекция 5-10 мг эстрадиола-валерианата в масляном растворе в конце гормональной стимуляции вызывает возобновление циклической деятельности яичников у всех обработанных бесплодных коров; усиливает проявление внешних признаков охоты и обеспечивает четкую синхронизацию охоты и некоторое повышение оплодотворяемости коров в первую охоту. Кроме того, наблюдения показали возможность варьирования дозами и сроками введения этого препарата, что наталкивает на мысль о необходимости определения минимально эффективной его дозы при условии повышения оплодотворяемости коров в первую синхронизированную охоту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полянцев Н.И. Воспроизводство в промышленном животноводстве. М.: 1990: 6-8.
2. Павлов В.А. Физиология воспроизводства крупного рогатого скота, 1984: 30-31.
3. Прокофьев М.И. Регуляция воспроизводства крупного рогатого скота, 1989: 10-13.
4. Britt J.H. Early postpartum breeding in dairy cows. A Review. J. Dairy Sci., 1975, 58: 266-271.
5. Claus R. et al. Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cows by progesterone assay in milk²-fat. Brit. Vet. J., 1983, 139: 29-37.
6. Dachiz et al. Ovarian activity of Holstein and jersey cows of diverse transmitting abilities for milk. J. Dairy Sci., 1984, 67: 1776-17782.
7. Duby R. et al. Progesterone synthesis and histology of postpartum bovine corpus luteum. Theriogenology, 1985, 23: 619.
8. Nash J.I. et al. Effect of reproductive performance of administration of In RH to early post-partum dairy cows. J. amin. Sci., 1980, 50: 1017.
9. Stevenson J., Call E.P. Influence of early estrus ovulation and insemination on fertility Holstein cows. Theriogenology, 1983, 19: 367.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОРМОВ, ОБРАБОТАННЫХ ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

И.А. Долгов, А.М. Материкин, С.И. Долгова
Лаборатория пищеварения

*Проведена оценка воздействия формальдегидной обработки кормов на микрофлору преджелудков жвачных на модели *Str. bovis*. Установлено, что защитный эффект при обработке кормов формальдегидом не связан с бактерицидным действием формальдегида и*

уменьшается с увеличением продолжительности хранения обработанного корма. Лимитирование роста *Str. bovis* при формальдегидной обработке кормов обусловлено снижением доступности не только азота, но и других питательных веществ. Их доступность для *Str. bovis* находится в обратной зависимости от дозы формальдегида, использованного для обработки. Снижение скорости роста и метаболической активности *Str. bovis* при внесении в среду обработанных формальдегидом кормов, может быть предотвращено введением в среду легко доступных источников энергии и азота.

Введение

В современных научных концепциях протеинового питания жвачных животных основное внимание уделяется оптимизации микробиологических процессов в преджелудках. Известно, что интенсивность и направленность микробиологической трансформации питательных веществ кормов в необходимые для животных метаболиты определяется их доступностью.

В настоящее время принято считать, что защита кормовых белков от разрушения в рубце достигается в результате снижения их растворимости и доступности для микрофлоры. Однако в литературе мало данных о влиянии скармливания обработанных различными дозами формальдегида кормов на микробиологические процессы в рубце и практически отсутствуют сведения о том, воздействует ли формальдегидная обработка на доступность для микрофлоры других питательных веществ и, в частности, углеводов. Не установлено также, в какой мере остаточные количества формальдегида воздействуют на бактерии рубца и как долго сохраняется защитный эффект после формальдегидной обработки.

Материал и методы

В поисках ответов на указанные во введении вопросы нами было проведено несколько серий опытов *in vitro*, в которых в качестве питательных субстратов использовались концентрированные корма, обработанные формальдегидом.

Первоначально мы поставили задачу выяснить, как отражается формальдегидная обработка подсолнечного шрота на интенсивность роста *Str. bovis*, являющегося основным обитателем рубца и индикатором биологической полноценности рациона и нормального физиологического состояния животных. Для выделения *Str. bovis* из содержимого рубца жвачных использовали крахмальный агар с рубцовой жидкостью (1) и синтетическую среду с глюкозой, целлобиозой и крахмалом (2). Подсолнечный шрот смешивали с формальдегидом из расчета 0,2-1,0%

от массы протеина, высушивали при комнатной температуре и использовали для приготовления среды.

В последующих сериях опытов изучали влияние комбикормов, обработанных средними дозами формальдегида, на интенсивность роста *Str. bovis*. Были определены факторы, лимитирующие его рост, а также изучена адаптация *Str. bovis* к формальдегиду.

Перед засевом бактерий среду насыщали углекислым газом и колбочки закрывали резиновыми пробками с дефлегматорами. В качестве посевного материала использовали суточную культуру стрептококков, которую вносили из расчета 5% к объему среды и инкубировали при 39°C. Затем готовили ряд разведений и учитывали численность бактерий под микроскопом. Кроме того, подсчет количества бактерий проводили также после выращивания их на крахмально-пептонно-дрожжевом агаре с последующим пересчетом на вес сухой биомассы, которую определяли по калибровочной кривой. Амилазную активность культуральной жидкости определяли фотометрическим методом (3), рН – электрометрически. Содержание белка в биомассе определяли по методу Лоури (5), а концентрацию растворимых и легко гидролизуемых углеводов с антроновым реактивом (4).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что с увеличением дозы формальдегида, используемого для обработки подсолнечникового шрота, интенсивность роста стрептококков уменьшается, т.е. между этими показателями наблюдалась обратная зависимость (табл. 1). Уже при дозе формальдегида 0,2% биосинтез бактериальной массы достоверно ингибировался. С увеличением дозы формальдегида до 0,5% интенсивность роста *Str. bovis* снижалась на 58,3-60,7%, а практически полное прекращение развития этих бактерий наблюдалось при повышении концентрации формальдегида до 0,9-1,0% от массы протеина.

Таблица 1. Интенсивность синтеза биомассы *Str. bovis* на средах с подсолнечным шротом, обработанным формальдегидом, мг/мл

Но- мера штам- мов	Концентрация формальдегида, г/100г протеина									
	0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
3	7	2	1	0	7	5	4	3	1	0
	8	1	7	5	0	7	3	2	6	8

	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	5	8	1 _B	5 _r	5 _r	8	3	3	1	1
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	6	1	0	9	6	4	4	3	1	0
	5	6	±	4	5	9	0	2	3	8
5	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	5	8 _r	5 _r	5 _r	5	3	3	1	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	2	8	7	7	4	3	3	2	0	1
	2	4	8	3	9	8	2	7	8	1
6	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	8 _a	8 _a	8 _a	3 _B	3	3	3	4	1
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	5	1	9	9	6	5	4	3	1	0
	7	1	7	2	5	1	3	5	1	3
7	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	1	8	3 ₆	5 _B	5	2	3	3	2	1
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	9	6	6	5	4	3	2	2	0	0
	7	7	2	7	0	0	4	2	8	8
10	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	5	8	5	3	3	3	3	1	1

а а в

Примечание: а – P < 0,05; б – P < 0,02; в – P < 0,01; г – P < 0,01.

В следующее серии опытов нами испытаны 4 комбикорма. Комбикорма 1 и 2 были идентичными по составу, но входящий в комбикорм 2 подсолнечный шрот обрабатывали формальдегидом из расчета 0,5% от массы протеина. Комбикорма 3 и 4 состояли из одних и тех же ингредиентов, но последний был подвергнут формальдегидной обработке в дозе 0,5% от массы протеина. Комбикорма 1 и 2 отличались от комбикормов 3 и 4 составом компонентов.

Исследования показали, что наиболее интенсивный рост *Str. bovis* наблюдался на средах с обычными комбикормами 1 и 3, тогда как формальдегидная обработка подсолнечного шрота комбикорма 2 и всего комбикорма 4 уменьшала интенсивность роста стрептококков на 34,0 и 54,0% соответственно. При этом удельная скорость роста снижалась на 22 и 24%, а амилазная активность на 27,8 и 46,0% соответственно (табл. 2).

Таблица 2. Интенсивность роста и амилазная активность *Str. bovis* на средах с различными комбикормами

Показатели	Комбикорма			
	1 (кон- троль)	2 (опыт)	3 (кон- троль)	4 (опыт)
Биомасса, мг/мл	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1 ^а	1,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ^б
Удельная скорость роста, час ⁻¹	0,32	0,25	0,33	0,25
Амилазная активность, ед/мл	41,0 ± 4,3	29,6 ± 1,8	46,4 ± 2,7	25,1 ± 2,6
Реакция среды культуры (рН)	4,9 ± 0,1	5,9 ± 0,1	4,6 ± 0,1	6,4 ± 0,1

Подобные данные получены и по суммарной микрофлоре рубца при ее инкубации с испытуемыми комбикормами (табл. 3). Как и в опытах с чистыми культурами *Str. bovis*, обработанные формальдегидом комбикорма 2 и 4, в сравнении с контрольными (1 и 3), не обеспечивали адекватного роста амилитических, молочнокислых, протеолитических, пектолитических и усваивающих азот мочевины бактерий, т.е. формальдегидная обработка комбикормов оказала выраженное ингибирующее действие на микрофлору рубца. Следует однако отметить, что скармливание этих же комбикормов не отдельно, а в составе рациона, значительно снижало их ингибирующее действие на микрофлору, что, по-видимому, объясняется удовлетворением ее потребностей в питательных веществах за счет грубых и сочных кормов рациона.

В следующей серии *in vitro* опытов нами были испытаны в качестве питательных субстратов нативный соевый шрот (1 опыт), обработанный формальдегидом соевый шрот (2 опыт), комбикорм, в состав которого входил нативный соевый шрот (3 опыт) и комбикорм, в котором соевый шрот был обработан формальдегидом из расчета 1 г на 100 г сырого протеина (4 опыт).

Таблица 3. Количество бактерий, выросших на селективных средах (24-часовая инкубация суммарной микрофлоры рубца с различными комбикормами), млн/мл

Бактерии	Комбикорма			
	1	2	3	4
Амилолитические	15,00 ± 1,9	9,33 ± 0,8	19,67 ± 1,0	15,35 ± 1,6
Молочнокислые	17,67 ± 0,6	10,67 ± 0,8 ^б	13,33 ± 0,8	9,67 ± 0,8
Протеолитические	12,67 ± 1,1	9,23 ± 0,6	14,67 ± 0,8	10,0 ± 0,7 ^а
Усваивающие азот мочевины	14,67 ± 0,2	8,33 ± 0,3 ^б	16,33 ± 1,1	11,00 ± 1,0 ^а
Пектолитические	2,67 ± 0,6	1,32 ± 0,3	1,93 ± 0,2	1,27 ± 0,1

Примечание: достоверность разницы показана между комбикормами 1и 2, 3 и 4. а – P < 0,05; б – P < 0,02; в – P < 0,01.

Исследования показали, что при введении в среду обработанного формальдегидом соевого шрота интенсивность роста и амилазная активность *Str. bovis* снижались на 25,5 и 15,8% соответственно, тогда как при внесении в среду комбикорма, в состав которого входил обработанный формальдегидом соевый шрот, интенсивность накопления биомассы стрептококков и их амилазная активность уменьшились всего лишь на 14,3 и 12,4% соответственно (табл. 4). Следовательно, использование обработанного формальдегидом соевого шрота в составе комбикорма в меньшей степени лимитировало рост микроорганизмов по питательным веществам, вероятно, за счет использования незащищенной части компонентов комбикорма.

Таблица 4. Интенсивность роста и амилазная активность *Str. bovis* с различными питательными субстратами в среде

Субстрат	Биомасса, мг/мл	% к контролю	Амилазная активность	% к контролю
Нативный соевый шрот (контроль)	1,27 ± 0,08	100	24,52 ± 3,1	100
Обработанный формальдегидом соевый шрот (опыт)	0,81 ± 0,13	64	20,64 ± 3,73	84
Комбикорм, содержащий соевый шрот (контроль)	1,51 ± 0,05	100	38,28 ± 2,07	100
Комбикорм, содержащий обработанный формальдегидом соевый шрот (опыт)	1,29 ± 0,11	86	33,85 ± 2,49	88

Исходя из того, что потребности микроорганизмов в азоте удовлетворяются в основном за счет растворимых фракций кормового азота, можно предположить, что формальдегидная обработка подсолнечного шрота или всего комбикорма, уменьшая растворимость белков, лимитирует обеспечение микрофлоры азотом. Экспериментальная проверка подтвердила это предположение (табл. 5).

Таблица 5. Количество *Str. bovis*, выросших на средах с различными фракциями протеина подсолнечного шрота, млрд/мл

Фракции протеина	Подсолнечный шрот	
	нативный	обработанный формальдегидом
Растворимая	9,66 ± 0,80	6,20 ± 0,39 ^a
Нерастворимая	3,33 ± 0,81 ^b	2,80 ± 0,29 ^г

Внесение в среду подсолнечного шрота, обработанного формальдегидом, сопровождалось снижением числа стрептококков на средах с растворимой фракцией на 35,8% и с нерастворимой на 16%.

При изучении динамики биосинтеза биомассы было выявлено, что наиболее интенсивный рост *Str. bovis* на среде с необработанным подсолнечным шротом наблюдался в течение первых суток культивирования, с незначительным повышением в последующие сутки выращивания (табл. 6). При внесении в среду подсолнечного шрота, обработанного формальдегидом, равномерное накопление биомассы продолжалось в течение всего периода культивирования стрептококков. Известно, что корма с высокой доступностью для микрофлоры протеина, в сравнении с низкой, лучше обеспечивают потребности микрофлоры в азоте. Однако быстрый распад протеина с образованием избыточного количества аммиака сопровождается повышенным выделением азота с мочой, что снижает его использование организмом животного. Следует иметь в виду и то, что реакция бактерий на высокопротеиновую добавку, по-видимому, в значительной мере зависит от состава рациона, количества и качества протеина, а также природы углеводов и их соотношения.

Таблица 6. Динамика накопления биомассы *Str. bovis* на средах с нативным и обработанным формальдегидом подсолнечным шротом, мг/мл

Продолжительность культивирования, сутки	Подсолнечный шрот	
	нативный	обработанный формальдегидом
1	1,78 ± 0,05	0,56 ± 0,08
2	1,84 ± 0,11	0,85 ± 0,08
3	1,89 ± 0,03	0,97 ± 0,03

Лимитирование роста микроорганизмов снижением доступности питательных веществ корма после обработки формальдегидом подтверждено и в последующей серии исследований. Так, при включении в среду подсолнечного шрота, обработанного формальдегидом в дозе 0,5% от массы протеина, резко снижалась удельная скорость роста *Str. bovis*, его амилазная активность и образование лактата (табл. 7). Восполнение уровня растворимого азота в среде за счет мочевины до уровня контроля (3 опыт) хотя и повышало скорость роста и образование амилазы *Str. bovis*, но все-таки не достигало величин, наблюдавшихся в 1 опыте. Аналогичные данные получены и при добавлении в среду 0,1% крахмала (4 опыт). Совместное же внесение в среду доступного азота и энергии (5 опыт) полностью восстанавливало скорость роста и метаболическую активность *Str. bovis*. Следовательно, при формальдегидной обработке кормов лимитирование роста микрофлоры обусловлено снижением доступности не только азота, но и энергии (табл. 7).

Основываясь на полученных данных можно сделать заключение, что при скармливании жвачным обработанных формальдегидом концентратов, целесообразно вводить в рацион легкодоступные источники азота и энергии, которые обеспечивают высокую бродильную и синтетическую активность микроорганизмов и усиливают продуктивный эффект. Следует отметить, что формальдегидная обработка корма существенно не изменяла химический состав биомассы *Str. bovis*, однако увеличение уровня доступной энергии в среде при недостатке растворимого азота (опыт 4) заметно снижало содержание в биомассе белка и повышало уровень углеводов (табл. 7).

Исследования также показали, что доступность для стрептококков протеина подсолнечного шрота, обработанного формальдегидом, в значительной степени зависит от продолжительности его хранения. Установлено, что с увеличением срока хранения корма, обработанного формальдегидом, доступность протеина возрастает. Очевидно в процессе хранения происходит разрыв связей с белком и альдегидом.

Для некоторых микроорганизмов источниками углерода могут служить одноуглеродные соединения, например, формальдегид и муравьиная кислота. Часть микроорганизмов окисляет данные соединения до углекислоты, которая затем включается в клетки. Исходя из этого нельзя исключить, что у микроорганизмов рубца также существуют пути катаболизма формальдегида, свойственные многим микроорганизмам из других мест обитания. Можно предположить, что при скармливании животным обработанных формальдегидом кормов, в

преджелудках жвачных появляются микроорганизмы с повышенной резистентностью к формальдегиду. Если это так, то при наличии в среде формальдегида они должны более интенсивно развиваться.

В связи с этим мы решили выяснить возможность адаптации микрофлоры рубца к формальдегиду.

Таблица 7. Интенсивность роста, метаболическая активность и химический состав *Str. bovis* при разных условиях культивирования

№ опыта	Питательные субстраты в среде	Биомасса, мг/мл	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Амилазная активность ед/мл	Лактат, мг%	рН	Химический состав биомассы, г/100г			
							белок	углеводы		
								растворимые	легко-гидролизуемые	всего
1	Необработанный подсолнечный шрот (контроль)	1,73 ± 0,08	0,34	36,27 ± 2,4	8,6	4,7	49,8	5,8	24,8	30,6
2	Подсолнечный шрот, обработанный формальдегидом	0,51 ± 0,05 ^F	0,12	17,96 ± 3,8	4,7	6,6	45,7	6,1	27,6	33,7
3	Подсолнечный шрот, обработанный формальдегидом + мочевиной	1,54 ± 0,05	0,31	34,88 ± 2,6	6,9	5,4	50,6	5,4	21,4	26,8
4	Подсолнечный шрот, обработанный формальдегидом + крахмал	1,46 ± 0,08	0,30	43,67 ± 2,4	7,5	5,0	38,4	5,5	31,7	38,9
5	Подсолнечный шрот, обработанный формальдегидом + мочевиной + крахмал	1,81 ± 0,08	0,34	48,00 ± 2,7	8,9	5,5	49,8	5,5	25,0	30,5

В *in vitro* опытах изучено влияние формальдегида на интенсивность роста исходной культуры *Str. bovis* и его варианта, полученного после многократных пересевов на среде с комбикормом, обработанным формальдегидом. Контролем служила исходная культура стрептококков, которую выращивали на обычном комбикорме.

Установлено, что добавление в питательную среду формальдегида в количестве 0,4 мг/мл приводит к замедлению роста культуры. Однако у штамма, выращенного на среде с комбикормом, обработанным формальдегидом, рост возобновлялся раньше и через 12 ч после добавления формальдегида содержание биомассы у адаптированного к формальдегиду штамма было в 2,5 раза выше ($P < 0,001$), чем у неадаптированного. Более высокая концентрация формальдегида (0,6 мг/мл) оказалась губительной для неадаптированного штамма – сразу после добавки формальдегида рост клеток прекращался, а затем начало уменьшаться количество биомассы из-за автолиза клеток. Рост этого штамма не начинался даже через 36 ч после добавки формальдегида, в то время как адаптированный к формальдегиду штамм после временного прекращения роста вновь начал размножаться. Вместе с тем, следует отметить, что адаптированный к формальдегиду штамм не отличался от неадаптированного по интенсивности накопления биомассы при культивировании на средах без формальдегида.

Заключение

На основании полученных данных мы пришли к заключению, что микробиологический способ позволяет сравнительно быстро и надежно проводить оценку качества протеина корма (эффективности «защиты» протеина), а также прогнозировать интенсивность синтеза бактериальной массы. Это позволяет регулировать интенсивность микробиологических процессов в преджелудках жвачных. Способ сравнительно прост в использовании, не требует дорогостоящей аппаратуры, исключает использование для этой цели животных, а следовательно, затраты на их содержание.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгов И.В. Выделение и идентификация амилотических бактерий рубца жвачных. Новые методы и модификация биох. исслед. в животноводстве. Боровск, 1972: 82.
2. Долгов И.А. Питательная среда для обнаружения микроорганизмов рубца, усваивающих азот мочевины. А.с. 1306951, 1987, Б.И. 16.

3. Долгов И.А. *Определение амилазной активности крахмалгидролизующих бактерий фотометрическим методом. Изучение микрофлоры преджелудков у жвачных. Методические указания. Боровск, 1977: 40.*
4. Раецкая Ю.И., Дрозденко Н.П., Липман С.И. *Определение растворимых и легкогидролизуемых углеводов в кормах. Методические рекомендации по химическим и биохимическим исследованиям в зоотехнии. Дубровицы, ОНТИ, 1975.*
5. Zowzy D.H., Rosebrought N.J., Farr A.Z., Randall R.J. *Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193, 1: 265-275.*

**ФИЗИОЛОГИЯ, МОРФОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ
ЖИВОТНЫХ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА МЯСО**

**КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА МЫШЕЧНЫХ
БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У БЫЧКОВ РАЗНОГО
НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ**

*К.Т. Еримбетов, Б.Д. Кальницкий, М.Д. Аитова, Н.В. Фофана,
П.В. Матющенко, А.П. Баранов, О.М. Павлова*
Лаборатория белково-аминокислотного питания

При изучении метаболизма у бычков разного направления продуктивности установлено, что выявленное у бычков мясного направления (герефорды) более интенсивное накопление мышечной массы в период доращивания и в начальной фазе откорма, по сравнению с бычками молочного типа (холмогоры), в значительной мере обусловлено более низкой скоростью оборота белка мышечной ткани. Это, в свою очередь способствует экономному расходованию энергетических субстратов в мышцах и большему, чем у бычков холмогорской породы, отложению энергии в жировых депо в форме липидов.

Введение

В настоящее время усилия исследователей направлены на разработку способов управления количественными и качественными параметрами мясной продуктивности. Несомненно, что наряду с селекционной работой решение проблемы включает в себя также усовершенствование условий питания, обусловленное познанием породных и возрастных закономерностей метаболизма и раскрытием механизмов, управляющих этими процессами. В литературе интенсивно обсуждаются факторы, тормозящие с возрастом процессы синтеза и накопления белка в скелетных мышцах и сдерживающие рост животных. Снижение темпов наращивания скелетной мускулатуры, по мере созревания животных, исследователи связывают с усилением отложения жира в теле и замедлением процессов обновления мышечных белков, вследствие изменения их состава (1, 2). Поэтому результативность разрабатываемых способов управления процессами формирования мясной продуктивности была бы значительно выше, если бы наука располагала достаточной информацией о закономерностях формирования мышечной и жировой ткани и механизмах, регулирующих метаболические процессы

в ней. В связи с этим в задачу настоящих исследований входило изучение закономерностей метаболизма основных белков в скелетных мышцах и липидов в жировой ткани у бычков контрастных пород разного возраста.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнена на бычках холмогорской и герефордской пород, по 5 животных в группе. Продолжительность опыта с 8- до 15,5-месячного возраста. До постановки на опыт бычки-герефорды находились вместе с матерями на пастбище, холмогоры – на привязном содержании. Живая масса бычков на начало эксперимента составляла 188 и 184 кг соответственно у холмогоров и герефордов. Содержание животных в период опыта привязное, кормление индивидуальное. Рацион для всех бычков был одинаковым и включал сено злаковое, силос разнотравный и комбикорм. Уровень кормления животных был рассчитан на обеспечение интенсивного выращивания и откорма (3). Рецепты комбикорма и премикса были аналогичными и разработаны для интенсивного выращивания и откорма бычков (4). Концентраты составляли 53-56% обменной энергии рациона.

Для контроля интенсивности роста ежемесячно животных взвешивали 2 дня подряд до утреннего кормления. В ходе эксперимента провели балансовые опыты (в 12- и 14-месячном возрасте) с целью определения переваримости и усвоения азотистых веществ корма. В возрасте 15,5 месяцев животных убили и провели оценку состава туши, морфологические и биохимические исследования проб мышечной и жировой ткани. В 12-, 14- и 15,5-месячном возрасте у бычков брали пробы крови пункцией яремной вены до кормления и через 3 часа после него. В пробах плазмы крови определяли концентрацию свободных аминокислот на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339 и мочевины (5) химическим методом.

В качестве интегральных показателей, характеризующих интенсивность и направленность метаболических процессов, были избраны скорости отложения мышечных белков и накопления мышечной ткани. Для их расчета в 12-, 14- и 15,5-месячном возрасте у животных определяли суточную экскрецию с мочой креатинина, содержание которого пропорционально количеству мышечной ткани в организме бычков. На основании этих данных рассчитывали количество мышечной ткани и среднесуточную скорость ее накопления. В образцах мышечной ткани, взятой путем биопсии, определяли концентрацию белков и по ней, с учетом количества мышечной ткани, рассчитывали скорость отложения мышечных белков. Определение суточной экскреции 3-метилгистидина с мочой в эти периоды позволило определить скорость

распада мышечных белков с использованием коэффициентов, предлагаемых Goppinath R. et al. (6), Nishisawa et al. (7) и нашей лабораторией. Концентрацию 3-метилгистидина определяли на аминокислотном анализаторе ААА-Т-339, содержание креатинина химическим методом (8).

Пробы мышечной и жировой тканей брали биопсией длиннейшей мышцы спины в области 1-3 поясничных позвонков и в области грудины, соответственно. В образцах подкожной жировой ткани оценивали *in vitro* интенсивность процессов липогенеза по скорости включения ¹⁴С-ацетата и скорость липолиза по выделению в инкубационную среду НЭЖК и глицерола. Проводили морфологический анализ диаметра мышечных волокон и содержания ядер в них. Число и размер адипоцитов определяли с помощью предварительной фиксации образцов ткани тетрооксидом осмия (9).

Химический анализ мышечной ткани (сухое вещество, азот, липиды) проводили по общепринятым методам (10). В пробах длиннейшей мышцы спины определяли также белковые фракции (саркоплазматические, миофибриллярные и стромальные белки) по Helander E. (11).

Математическую обработку данных проводили стандартными методами (12).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что несмотря на то, что на протяжении всего эксперимента бычки породы геррефорд по интенсивности роста несколько уступали животным молочной породы (среднесуточный прирост за опыт составил, соответственно, 1051±34 и 1118±42 г), тем не менее по уровню и интенсивности наращивания мышечной ткани и по отложению белка в мышцах в период доращивания и в начале откорма они существенно превосходили сверстников холмогорской породы (табл. 1, 2).

Таблица 1. **Интенсивность накопления мышечной ткани у бычков с 12- по 15,5-месячный возраст (мг креатинина/кг живой массы в сутки)**

Порода	Возраст, мес		
	12	14	15,5
Геррефорды	25,35±0,54	24,64±0,52	24,41±0,56
Холмогоры	24,23±0,44	23,58±0,41	24,11±0,52

Что касается возрастных особенностей, то у бычков геррефордской породы некоторое снижение интенсивности накопления мышечной ткани, наступившее после 12-месячного возраста, продолжалось до конца опыта (15,5-месячного возраста). У холмогорских бычков после спада указанного показателя к 14-месячному возрасту снова наступил

подъем и к концу опыта интенсивность накопления мышечной ткани почти достигла уровня 12-месячного возраста.

Таблица 2. Сравнительная характеристика обмена мышечных белков у бычков разного возраста, г/кг ЖМ^{0,75}/сут

Показатели	Порода			
	герефордская		холмогорская	
	14 мес	15,5 мес	14 мес	15,5 мес
Синтез	7,00±0,49	6,35±0,30	8,36±0,51	6,64±0,34
Распад	5,55±0,46	5,24±0,23	7,19±0,35	5,57±0,16
Отложение	1,45±0,17	1,11±0,08	1,17±0,13	1,07±0,10
Эффективность синтеза, %	20,7	17,5	14,0	16,1
Отношение синтез/распад	1,26	1,21	1,16	1,19

Аналогичные данные получены и по интенсивности деградации белка скелетных мышц. Как видно из рис. 1, относительная деградация мышечных белков во все периоды исследования была ниже у герефордских бычков (на 11-27%). Как известно, величина отложения мышечных белков и, соответственно, прирост мышечной ткани зависят от соотношения интенсивности двух противоположных процессов – син-

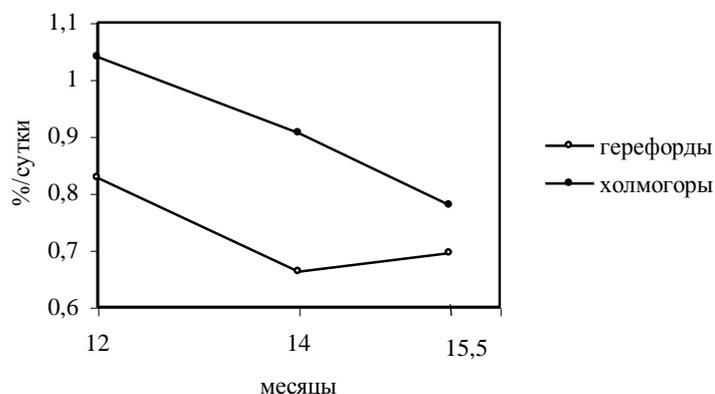


Рис. 1. Относительная деградация мышечных белков у бычков разного генотипа

теза и распада белков. Поэтому у герефордских бычков отложение мышечных белков в возрасте 14- и 15,5-месяцев в расчете на 1 кг метаболической массы было выше на 23,9 и 3,7%, соответственно, чем у холмогоров. При этом, как следует из таблицы 2, повышенное отложение белков скелетных мышц у герефордов происходило не

вследствие усиления скорости их синтеза, а за счет более низкой скорости деградации. В результате этого у них выше была и эффективность биосинтеза белка, по сравнению с холмогорами. Аналогичные результаты были получены Berg R.T. (13) и Bridges T.C. (14), которые показали, что отличительной особенностью животных мясных пород является низкая скорость синтеза мышечного белка при пониженной скорости распада и высоком отложении его по сравнению с животными молочных пород. Таким образом, данные опыта указывают на то, что бычкам герефордской породы характерен пониженный оборот мышечного белка, что способствует более экономному расходованию энергии в мышечной ткани и повышению отложения ее в виде жировых запасов. Как видно из таблицы 3, наряду с увеличением эффективности синтеза мышечных белков, у бычков герефордской породы была достоверно выше интенсивность процессов липогенеза в жировой ткани, в сравнении с

Таблица 3. Интенсивность липогенеза в подкожной жировой ткани бычков, нмоль ацетата на 1г ткани за 2 часа

Возраст, месяцы	Герефорды	Холмогоры
12	936±250,9*	168±34,5
14	897±64,1***	540±61,3
15,5	135±8,6*	98±7,9

Здесь и далее достоверность межпородных различий: P<0,05*; P<0,01**;
P<0,02***

холмогорами. У герефордов наблюдалась также тенденция к более высокой интенсивности процессов липолиза в жировой ткани (табл. 4).

Таблица 4. Интенсивность липолиза в подкожной жировой ткани бычков, нмоль НЭЖК на 1г ткани за 2 часа

Возраст, месяцы	Герефорды	Холмогоры
12	1499±223,6	1339±118,6
14	1304±118,4	1191±85,2
15,5	1574±23,6	1379±88,1

Следовательно, повышение накопления липидов в жировых депо у молодняка крупного рогатого скота сопровождается активацией как процессов синтеза липидов, так и их распада, но соотношение между ними остается в пользу липогенеза. На эту закономерность в формировании жировой ткани бычков герефордской породы указывают и данные концентрации триацилглицеролов и НЭЖК в плазме крови (табл. 5).

Результаты биохимических анализов подтвердились и данными морфологических исследований. В указанные выше возрастные периоды у герефордов диаметр адипоцитов в подкожной жировой ткани был достоверно выше, чем у холмогоров, что указывает на более интенсивное накопление в них липидов (табл. 6). При этом выявлена положительная корреляция между интенсивностью липогенеза и диаметром адипоцитов в подкожной жировой ткани бычков ($r=+0,85$; $P<0.01$).

Таблица 5. Концентрация общих липидов и классов липидных соединений в плазме крови бычков разных пород, мг/%

Показатели	Возраст 12мес		Возраст 15,5мес	
	герефорды	холмогоры	герефорды	холмогоры
Общие липиды	341±22,6	335±11,1	473±23,1	453±24,2
Фосфолипиды	126,9±6,9	125,1±4,2	180,6±12,0	175,9±10,9
Холестерин свободный	17,2±1,3	14,8±2,5	22,4±1,4	19,0±3,0
НЭЖК	19,0±1,2	18,1±2,0	25,4±3,0	22,5±1,1
Триацилглицеролы	45,5±3,8	43,8±2,5	61,5±1,9	53,9±2,7*
Эфиры холестерина	132,5±9,1	132,1±4,0	188,5±7,9	181,0±11,9

Таблица 6. Диаметр адипоцитов в подкожной жировой ткани бычков, мкм

Возраст, месяцев	Герефорды	Холмогоры
12	74,91±4,59	64,60±3,45
14	87,93±1,90**	78,25±2,90
15,5	77,55±6,31*	62,68±3,70

Что касается интенсивности накопления липидов в мышцах, то она имела такую же тенденцию, как и в подкожной жировой ткани. Так, у герефордских бычков концентрация липидов в длиннейшей мышце спины была на 20-43% выше, чем холмогорских животных (табл. 7). Более высокие значения по этому показателю были у герефордов и в гомогенате мышц, полученных после убоя животных (табл. 8).

Таблица 7. Концентрация белка и липидов в длиннейшей мышце спины бычков, %

Возраст, мес	Герефорды		Холмогоры	
	белок	липиды	белок	липиды
12	18,93±0,61	1,18±0,01*	19,83±0,35	0,98±0,06
14	20,29±0,58	1,85±0,09*	20,32±0,51	1,21±0,11
15,5	20,45±0,24	2,07±0,04	20,00±0,13	1,45±0,20

Установлены межпородные различия и в распределении липидов в жировых депо, а также в соотношении белковых фракций в скелетных мышцах. У геррефордов, по сравнению с холмогорами, достоверно (на 16,7 %) меньше была масса околопочечного жира и на 43% больше содержание жира в длиннейшей мышце спины, при отсутствии существенных различий в концентрации белка (табл. 7, 10). Бычки геррефордской породы в течение всего опыта отличались более высоким содержанием полноценных и низким неполноценных белков (табл. 9).

Таблица 8. Химический состав мышц у 15,5-месячных бычков, %

Показатели	Порода	Длиннейшая мышца спины	Гомогенат средней пробы мышц
Сухое вещество	геррефордская	24,79±0,15	29,54±0,54
	холмогорская	24,66±0,12	27,63±0,68
Белок	геррефордская	20,55±0,26	18,92±0,52
	холмогорская	19,99±0,15	19,38±0,23
Общие липиды	геррефордская	2,07±0,04*	9,54±0,56*
	холмогорская	1,45±0,20	6,30±0,74
Зола	геррефордская	1,02±0,04	1,00±0,03
	холмогорская	1,00±0,03	0,98±0,008
Калорийность мяса, ккал/кг	геррефордская	—	3781,5±387,9
	холмогорская	—	2903,4±278,9

Таблица 9. Концентрация белковых фракций в длиннейшей мышце спины у бычков разных пород, г%

Фракции белка	Порода	
	геррефорды	холмогоры
	Возраст 12 месяцев	
Саркоплазматическая	7,26±0,4	7,3±0,3
Миофибриллярная	8,77±0,26	9,1±0,16
Стромальная	2,81±0,11***	3,31±0,11
Качественный показатель белков	5,71±0,08*	4,98±0,26
	Возраст 14 месяцев	
Саркоплазматическая	7,75±0,13	7,72±0,19
Миофибриллярная	9,34±0,55	8,61±0,09
Стромальная	3,42±0,11	3,99±0,24
Качественный показатель белков	5,04±0,34*	4,14±0,19
	Возраст 15,5 месяцев	
Саркоплазматическая	7,18±0,16	7,2±0,11
Миофибриллярная	10,17±0,13	9,34±0,4
Стромальная	2,34±0,47	3,41±0,32
Качественный показатель белков	5,87±0,73	5,08±0,59

Результаты прижизненной оценки интенсивности процессов синтеза белков и липидов подтвердились данными, полученными после убоя животных в 15,5-месячном возрасте. Несмотря на меньшую предубойную живую массу, в туше бычков герефордской породы по сравнению с холмогорами масса мякоти была несколько выше, а ввиду того, что у них масса костей была на 11,1% ниже, отношение количества мякоти к массе костей у них оказалось на 24% выше, чем у холмогоров (табл. 10).

Таблица 10. Результаты обвалки туш бычков

Показатели	Герефорды	Холмогоры
Масса туши, кг	210,2±3,1	215,9±6,2
Масса мякоти, кг	174,4±2,4	172,3±5,3
Масса костей, кг	35,8±1,9*	43,7±1,7
Коэффициент мясности	4,91±0,27*	3,96±0,15
Процент мякоти от ж,м,	45,5±0,84*	43,0±0,63
Масса окопечного жира, кг	4,5±0,25*	5,4±0,20

Эти данные указывают на лучшую омускуленность туш у бычков герефордской породы.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что интенсивность наращивания мышечной массы у молодняка крупного рогатого скота в значительной мере обусловлена направленностью метаболизма белка в скелетных мышцах и зависит от соотношения скоростей противоположно направленных процессов – синтеза и распада мышечных белков в организме. Поскольку у бычков герефордской породы скорость распада мышечных белков была существенно ниже, чем у холмогоров, а скорость синтеза белка незначительно ниже, это обусловило большее отложение белка в мышцах и большую интенсивность накопления мышечной массы у них, чем у холмогорских бычков. Такая направленность метаболизма белка в мышечной ткани (т.е. снижение скорости оборота белка) у герефордов способствовала более экономному расходованию энергетических субстратов в мышцах и большему, чем у холмогоров, отложению энергии в виде липидов в жировых депо. Это предполагает, с одной стороны, пересмотр условий питания герефордских бычков (поскольку бычки обеих пород находились в одинаковых условиях), с другой стороны, дальнейший поиск путей снижения скорости деградации мышечных белков у бычков молочной породы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergen W.G. Protein synthesis in animal methods. J. Anim. Sci., 1974, 38, 5: 1079-1091.
2. Bullard F. J., Gunn J.M. Nutritional and hormonal effects on intracellular protein catabolism. Nutr. Rev., 1982, 40: 33-42.
3. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. Под ред. А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова, В.Н. Баканова и др. М.: Агропромиздат, 1985: 352.
4. Наставление по технологии выращивания и откорма крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971: 30.
5. Coulambe S.S., Fawrean S. New the semimicro method determination of urea. Clin. Chem., 1963, 9: 23.
6. Gopinath R., Kitts W.D. Growth, N-methylhistidine excretion and muscle protein degradation in growing beef steers. J. Anim. Sci., 1984, 59: 1262-1269.
7. Nishizawa N., Joyoda Y., Noguchi T. et al. N-methylhistidine content of organs and tissues of cattle and an attempt to estimate fractional catabolic and synthesis rates of myofibrillar proteins of skeletal muscle during growth by measuring urinary output of N-methylhistidine. Brit. J. Nutr., 1979, 42: 247.
8. Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968: 18-20.
9. Etherton J.D. et al. J. Anim. Sci., 1976, 42: 1344.
10. Лебедев П.Т., Усович А.Т. Методы исследования кормов и тканей животных. М.: Россельхозиздат, 1976: 389.
11. Helander E. On quantitative muscle protein determination sarcoplasm and myofibrillar protein content of normal and atrophic skeletal muscle. Acta physiologica Scand., 1957, 41: 141.
12. Овсянников А.И. Основы опытного дела в животноводстве. М.: Колос, 1976: 210.
13. Berg R.T. Growth patterns of bovine muscle. Proc. Natr. Soc., 1986, 47, 6: 547-563.
14. Bridges T.C. A mathematical procedure for estimating animal growth and body composition. Transactions of ASAE. Am. Soc. Agr. Eng., 1994, 39: 1342-1349.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ОБЩИХ ЛИПИДОВ И ОБМЕН ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ОРГАНИЗМЕ БЫЧКОВ ГЕРЕФОРДСКОЙ И ХОЛМОГОРСКОЙ ПОРОД В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

О.М. Павлова

Лаборатория белково-аминокислотного питания

Данная работа является фрагментом комплексных исследований по изучению интенсивности и направленности метаболических процессов, определяющих скорость наращивания мышечной и жировой ткани у бычков разного направления продуктивности, с целью иден-

тификации факторов и механизмов, стимулирующих рост животных и определяющих качество мяса. В опыте на бычках холмогорской породы и герефордах в период выращивания и откорма выяснены различия жирнокислотного состава в плазме крови, печени, длиннейшей мышце спины и средней пробе мяса. Установлено, что обмен жирных кислот в организме бычков породы герефорд и холмогоров имеет существенные различия.

Введение

Метаболизм липидов в организме животных во многом зависит от возраста животных, вида, породы, условий кормления, содержания, интенсивности их выращивания и других факторов. Особый интерес представляют исследования по изучению особенностей обмена липидов в связи с возрастом животных и интенсивностью их выращивания. Генетический потенциал крупного рогатого скота на откорме позволяет получать среднесуточный прирост массы тела до 2 кг. Но, важным является не только масса прироста, но и ее качество (соотношение костной ткани и мышечной, содержание белка и жира). В связи с этим встает задача регуляции отложения в организме липидов или белка в определенных количествах и соотношениях.

Регулирование метаболизма липидов в скелетных мышцах является одним из реальных путей оптимизации производства высококачественного мяса. Вопрос состоит в том, в какой период постнатального развития, на какой из двух процессов (синтез белка или синтез липидов) наиболее целесообразно то или иное воздействие с целью управления ростом животного и соответственно, получения высококачественной продукции животных. Ограниченность знаний в этой области сдерживает разработку методов, средств и технологий, способствующих максимальному проявлению генетического потенциала мясной продуктивности крупного рогатого скота, в том числе, получения высококачественной говядины с определенным соотношением жира и белка в мясе.

Основной целью наших исследований явилось выяснение особенностей жирнокислотного состава плазмы крови, некоторых органов и тканей и организма в целом у бычков различного направления продуктивности, в связи с важной ролью высокомолекулярных жирных кислот в процессах метаболизма.

Материал и методы

Опыт проведен на бычках герефордской и холмогорской пород в период с 9- до 15,5-месячного возраста. Рацион бычков был сбалансирован по всем питательным и биологически активным веществам в

соответствии с нормами, разработанными для интенсивных технологий выращивания и откорма бычков (4), и на протяжении всего эксперимента состоял из злакового сена, силоса разнотравного и комбикорма. Уровень кормления животных был рассчитан на обеспечение интенсивного выращивания и откорма. Содержание бычков привязное, кормление индивидуальное. В течение эксперимента ежедневно учитывали потребление корма, а интенсивность роста животных оценивали по результатам взвешивания. В ходе эксперимента проведено два балансовых опыта. Перед постановкой животных на балансовый опыт были взяты пробы крови из яремной вены, а по окончании балансового опыта методом открытой биопсии брали пробы длиннейшей мышцы спины (на уровне последнего ребра и подкожного жира в области подгрудка). В возрасте 15,5 месяцев провели убой животных для взятия проб органов и тканей.

Для экстракции общих липидов из крови, органов и тканей использовали метод Фолча и др. (8). Количественно общие липиды определяли гравиметрическим методом (5). При разделении общих липидов плазмы крови на фракции использовали метод тонкослойной хроматографии, описанный А.В. Архиповым (3). Определение жирнокислотного состава общих липидов осуществляли методом газо-жидкостной хроматографии на приборе Хром-5.

Результаты и обсуждение

Особую роль в метаболизме липидов выполняет печень. В гепатоцитах печени представлены все биологические циклы синтеза и окисления жирных кислот, синтеза и распределения различных классов липидов, а также биологические циклы, интегрирующие углеводный, жировой и белковый обмен (1,2). Синтез жирных кислот в печени и других органах и тканях организма происходит в экстрамитохондриальных пространствах при участии ацетил-СоА.

В печени бычков холмогорской породы концентрация общих липидов была на 14% выше, чем у бычков породы герефорд (табл. 1). Это говорит о том, что у холмогоров, в возрасте 15,5 месяцев, биосинтетические процессы, связанные с синтезом липидных соединений в печени, были более выражены. Однако, содержание общих липидов в плазме крови у бычков холмогорской породы в этом возрасте было несколько ниже, чем у герефордов (453+24,2 мг% против 473+23,0 мг%), что возможно свидетельствует о различной интенсивности обмена липидов между кровью и печенью у животных разного направления продуктивности.

Таблица 1. Содержание общих липидов в тканях бычков разных пород в возрасте 15,5 месяцев, г%

Ткани	Герефорды	Холмогоры
Гомогенат средней пробы мяса (сухое вещество)	9,54±0,56	6,30±0,74 *
Печень	3,60±0,05	4,09±0,07

* – P < 0,05

Доминирующими жирными кислотами липидов печени у бычков обеих пород были пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты (табл. 2). Что касается различий по содержанию жирных кислот между группами животных, то нами обнаружено большее содержание линолевой (P<0,05) и арахидоновой кислот и меньшее олеиновой кислоты у герефордов, чем у холмогоров.

Таблица 2. Содержание основных жирных кислот и насыщенность липидов печени бычков разных пород в возрасте 15,5 месяцев (% к общему количеству жирных кислот)

Жирные кислоты	Герефорды	Холмогоры
C ₈	0,07±0,01	0,10±0,01*
C ₁₀	0,10±0,01	0,10±0,01
C ₁₂	0,12±0,01	0,10±0,01
C ₁₄	0,75±0,04	0,81±0,05
C ₁₆	24,14±0,49	24,26±0,13
C _{16:1}	1,39±0,14	1,55±0,24
C ₁₈	30,90±0,63	30,81±0,25
C _{18:1}	19,34±0,69	20,20±0,27
C _{18:2}	12,88±0,26	12,05±0,20*
C _{18:3}	2,16±0,27	2,10±0,12
C _{20:4}	2,62±0,48	2,04±0,10
Насыщенные	56,08	56,18
Ненасыщенные	38,39	37,93
ИНЛ	1,46	1,48

* – P < 0,05

Сумма ненасыщенных жирных кислот в общих липидах печени животных породы герефорд составила 38,39%, а у холмогоров – 37,94%, то есть, практически была одинаковой. Индекс насыщенности липидов был равен 1,46 и 1,48 соответственно для герефордов и холмогоров.

При сравнении жирнокислотного состава липидов плазмы крови и печени бычков разных пород установлено, что по набору жирных кислот они были практически идентичны, но по соотношению жирных кислот наблюдались некоторые различия. В общих липидах плазмы

крови содержание пальмитиновой кислоты составило 23,64-24,30%, стеариновой – 34,34-35,38%, олеиновой – 16,64-17,31%, линолевой – 26,89-17,86%, линоленовой – 0,41-0,29% и арахидоновой – 0,34-0,40%. У бычков обеих пород к возрасту 15,5 месяцев в липидах печени был выше процент содержания олеиновой и пальмитиновой кислот и меньше стеариновой и линолевой по сравнению с липидами плазмы крови. Так, в липидах печени бычков породы герефорд пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая кислоты составили соответственно 24,14%, 30,90%, 19,34%, 12,88%, тогда как в липидах плазмы крови эти кислоты находились в пределах 25, 35, 17 и 18%. Аналогичная закономерность обнаружена и у бычков холмогорской породы. Отсюда следует, что часть высокомолекулярных жирных кислот для синтеза липидов печени извлекается из крови, а большая часть синтезируется самой печенью из ацетата. Характерным является и то, что для синтеза липидов печени линолевая и стеариновая кислоты используются в меньших количествах у животных обеих пород.

По содержанию стеариновой кислоты в липидах плазмы крови и печени наблюдалась прямая взаимозависимость – чем больше ее содержится в липидах печени, тем выше ее содержание в крови. Повидимому, чем больше синтезируется стеариновой кислоты в печени, тем более активно она транспортируется кровью к жировым депо для синтеза липидов.

Концентрация общих липидов в длиннейшей мышце спины (табл. 3) у бычков породы герефорд в 12- и 14-месячном возрасте была достоверно выше, чем у холмогоров и составила соответственно 1,18 и 0,98 г% и 1,85 и 1,21 соответственно у герефордов и холмогоров ($P < 0,05$). Преимущество по содержанию общих липидов в длиннейшей мышце спины бычков породы герефорд сохранилось и в 15,5-месячном возрасте и составило 2,07 и 1,45 г% соответственно, но достоверной разницы в этом возрасте не обнаружено.

Таблица 3. Содержание общих липидов в длиннейшей мышце спины у бычков разных пород, %

Возраст, мес	Герефорды	Холмогоры
12	1,18±0,01	0,98±0,06 *
14	1,85±0,09	1,21±0,11 *
15,5	2,07±0,04	1,45±0,20

* – P < 0,05

Приведенные выше данные указывают на то, что в течение всего опыта у бычков породы герефорд, в сравнении с холмогорами, отмечено более интенсивное накопление липидов в мышечной ткани. Доминирующими жирными кислотами липидов длиннейшей мышцы спины у бычков обеих пород были пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты (табл. 4). По содержанию некоторых жирных кислот в липидах длиннейшей мышцы спины наблюдались достоверные различия между группами.

У бычков породы герефорд содержалось достоверно больше олеиновой кислоты (P<0,05) и достоверно меньше линолевой кислоты (P<0,05), чем у холмогоров. Сумма ненасыщенных жирных кислот у животных породы герефорд составила 51,56%, у холмогоров 49,50%.

Таблица 4. Содержание основных жирных кислот и насыщенность липидов в длиннейшей мышце спины бычков разных пород в возрасте 15,5 месяцев (% от общего количества жирных кислот)

Жирные кислоты	Герефорды	Холмогоры
C ₆	0,10±0,004	0,01±0,003
C ₈	0,01±0,003	0,01±0,002
C ₁₀	0,04±0,008	0,03±0,005
C ₁₂	0,03±0,01	0,03±0,01
C ₁₄	1,13±0,07	0,14±0,60
C ₁₆	22,37±0,47	23,06±0,28
C _{16:1}	1,57±0,09	1,44±0,06
C ₁₈	21,37±0,82	21,88±0,37
C _{18:1}	31,88±0,85	28,97±0,27*
C _{18:2}	15,15±0,27	16,08±0,09*
C _{18:3}	1,54±0,08	1,59±0,03
C _{20:4}	1,42±0,06	1,42±0,05
Насыщенные	44,96	46,70
Ненасыщенные	51,56	49,50
ИНЛ	0,87	0,94

* – P<0,05

Индекс насыщенности липидов был равен 0,87 и 0,94 у герефордов и холмогоров, соответственно. Характерным является также повышение уровня олеиновой кислоты в липидах длиннейшей мышцы спины при

одновременном понижении количества стеариновой. Если в липидах плазмы крови и печени бычков породы герефорд содержание олеиновой кислоты было 17% и 20,5% соответственно, то в липидах длиннейшей мышцы спины оно составило 33%. На основании данных по жирнокислотному составу липидов длиннейшей мышцы спины можно отметить, что у животных породы герефорд они характеризуются более высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, при тенденции к повышению олеиновой и уменьшению стеариновой кислот.

Концентрация общих липидов в гомогенате средней пробы мяса (табл. 5) у бычков породы герефорд в возрасте 15,5 месяцев составила $9,54 \pm 0,56$ г% и превышала таковой показатель у животных холмогорской породы на 51% ($P < 0,05$). Характерно, что в липидах средней пробы мяса у бычков обеих пород доминирующими жирными кислотами являлись миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты. При этом у бычков породы герефорд содержалось меньше миристиновой ($P < 0,05$) и линоленовой ($P < 0,05$) кислот, но больше олеиновой кислоты. Сумма ненасыщенных жирных кислот в мясе животных составила 51,53% и 51,19% соответственно у герефордов и холмогоров.

Таблица 5. Содержание основных жирных кислот и насыщенность липидов в гомогенате средней пробы мяса бычков разных пород в возрасте 15,5 месяцев (% к общему количеству жирных кислот)

Жирные кислоты	Герефорды	Холмогоры
C ₆	0,010±0,003	0,020±0,003
C ₈	0,040±0,007	0,050±0,005
C ₁₀	0,100±0,007	0,110±0,006
C ₁₂	0,15±0,01	0,12±0,01*
C ₁₄	0,92±0,03	1,09±0,05*
C ₁₆	22,47±0,17	22,27±0,36
C _{16:1}	1,38±0,06	1,53±0,07
C ₁₈	21,44±0,12	21,30±0,21
C _{18:1}	31,69±0,41	31,09±0,15
C _{18:2}	15,19±0,37	15,03±0,12
C _{18:3}	1,66±0,09	1,91±0,05*
C _{20:4}	1,61±0,11	1,64±0,08
Насыщенные	45,13	44,96
Ненасыщенные	51,53	51,19
ИНЛ	0,88	0,88

* – $P < 0,05$

Следует отметить, что в силу породных особенностей у животных породы герефорд больше отложилось межмышечного жира по сравнению с их сверстниками – холмогорами. При этом жир герефурдов содержал больше олеиновой кислоты.

Заключение

Проведенные эксперименты показали, что поскольку животные находились на одинаковом рационе и были одного возраста, некоторые различия по жирнокислотному составу связаны с породными особенностями. С возрастом у бычков обеих пород наблюдалась тенденция к снижению количества насыщенных жирных кислот и одновременному повышению суммы ненасыщенных жирных кислот в крови. Индекс насыщенности липидов также с возрастом снижался, что, вероятно, связано с использованием ацетата в синтезе высокомолекулярных жирных кислот в жировых депо, образование которого в преджелудках бычков возрастает. Таким образом, в скелетных мышцах герефордских бычков откладываются более высокоценные липиды в биологическом и пищевом отношении, так как индекс насыщенности липидов у них ниже, чем у холмогоров, а содержание олеиновой кислоты в липидах мышц выше.

У герефордских бычков отмечено повышенное содержание общих липидов в скелетных мышцах в 12-, 14- и 15,5-месячном возрасте и в средней пробе мяса. Это свидетельствует о генетической предрасположенности герефордских бычков к более раннему отложению подкожного, межмышечного и внутримышечного жира.

Интенсивное накопление жировой ткани в раннем возрасте, как показывают данные литературы, сопровождается снижением белкового синтеза (7), что было отмечено и в наших экспериментах. У герефордских бычков фаза зрелости наступает в более раннем возрасте, поэтому при разработке системы питания бычков разной направленности продуктивности и обсуждении вопросов, связанных с поиском путей регуляции качества мяса у молодняка крупного рогатого скота, необходимо этот момент иметь в виду и создавать условия для более интенсивного наращивания мышечной ткани в более раннем возрасте.

Определение соотношения высокомолекулярных жирных кислот, в частности, линолевой кислоты в липидах плазмы крови, олеиновой кислоты в липидах печени и длиннейшей мышцы спины, можно использовать при разработке биохимических тестов по контролю за интенсивностью роста молодняка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев А.А. Липидный обмен и продуктивность жвачных животных. М., 1980: 214-231.
2. Алиев А.А. Обмен веществ у жвачных животных. М., 1997: 202-204.
3. Архипов А.В. Основные методы определения липидных соединений. Разделение липидов с помощью тонкослойной хроматографии. В кн.: Методические указания по исследованию липидного обмена у сельскохозяйственных животных. Боровск, 1978: 61-66.
4. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов М.: Колос, 1971.
5. Скороход В.И., Стефаник М.Б. Методы исследования липидов в органах и тканях животных. Методы количественного определения липидов. 1983: 6-7.
6. Дж.Х.Б. Рой. Выращивание телят. М.:(перевод с англ.), 1982: 397.
7. Werner Y., Bergen. Protein sintesis in animal models. J. Anim. Sci., 1974, 38, 5: 1079-1091.
8. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.A. Simple methods for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 1957, 226: 497-509.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНСУЛЯРНОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БЫЧКОВ ГЕРЕФОРДСКОЙ И ХОЛМОГОРСКОЙ ПОРОД

В.А. Матвеев, В.П. Галочкина, И.А. Баранова
Лаборатория эндокринной регуляции обмена веществ
и продуктивности сельскохозяйственных животных

В опыте на бычках герефордской и холмогорской пород изучали функциональную активность эндокринных желез. Показали, что генотип молодняка крупного рогатого скота мясного направления реализуется в изменении активности регуляторных систем организма и, в первую очередь, в повышении функциональной активности инсулярного аппарата поджелудочной железы. При одинаковых условиях питания животных высокий уровень инсулина в плазме крови бычков герефордской породы обеспечивает более эффективное снабжение субстратами процессов биосинтеза белков и липидов в мышечной ткани, что способствует получению говядины высокого качества. По этой же причине у бычков герефордской породы меньше доля костей в туше и больше доля мякоти, выше отношение мякотной части к костям и

мякоти к жиру при более низких затратах питательных веществ корма на единицу продукции.

Введение

Различия в генотипе животных с разным потенциалом продуктивности находят отражение в активности функционирования регуляторных систем (нервной и эндокринной), что, в свою очередь, сопровождается изменениями в интенсивности и направленности метаболических процессов. В результате этого растущие и откармливаемые бычки с разной скоростью наращивают мышечную ткань и накапливают липиды в жировой ткани, что сопровождается разной эффективностью использования питательных веществ корма на рост животных. В настоящее время накоплена довольно значительная информация о роли эндокринной системы в регуляции обмена веществ у продуктивных животных. Наряду с этим, многие вопросы, прежде всего касающиеся механизма действия гормонов и их участия в реализации продуктивного потенциала сельскохозяйственных животных, изучены недостаточно. В организме происходит постоянное взаимодействие механизмов кратковременного гомеостатического контроля с системой гомеостатического управления обменом веществ. В настоящее время мы не располагаем достаточной информацией о механизмах, регулирующих интенсивность и направленность метаболических потоков в организме продуктивных животных.

В работах Бассет Дж. и Вика Т. (10, 11) установлено, что незначительное поступление углеводов в кровь из желудочно-кишечного тракта жвачных животных (на фоне сохраняющейся значимости глюкозы в обмене веществ) обусловило у них существенные отличия в метаболизме углеводов и, соответственно, в функционировании регуляторных систем. Несмотря на пониженное поступление глюкозы в кровь, инсулин занимает центральное место в регуляции метаболизма у жвачных животных. В предыдущих работах нами было показано, что чистопородные бычки молочных пород при интенсивном выращивании и откорме существенно различаются по функциональной активности ряда эндокринных желез, что в свою очередь определяет у них различия в интенсивности роста и показателях мясной продукции (1). Наиболее значимые различия между животными наблюдались в активности инсулярного аппарата поджелудочной железы. Бычки, обладающие высокой функциональной активностью инсулярного аппарата, при одинаковых условиях кормления и содержания, имели лучшие показатели мясной продуктивности. Эти данные свидетельствуют о ключевой роли инсулина в реализации потенциала мясной продуктивности у молодняка крупного рогатого скота молочных пород. В целях доказательства того, что данный факт не является случайным, а отражает отличия в

активности регуляторных систем, которые закреплены в генотипе животного, провели сравнительные исследования на бычках молочной и мясной пород.

Материал и методы

Данная работа является самостоятельной частью комплексных исследований института, направленных на познание природы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. Опыт проведен в виварии на бычках холмогорской и герефордской пород по 5 животных в группе. Продолжительность опыта с 8- до 15,5-месячного возраста. Бычков холмогорской породы до постановки на опыт выращивали в ОПХ «Ермолино» по стандартной схеме для племенных хозяйств молочного направления. Животных герефордской породы до 8-месячного возраста выращивали по традиционной схеме для мясного скотоводства. Они находились в одном стаде с матерями на пастбище. Живая масса бычков на начало опыта в 8-месячном возрасте составила 188 и 184 кг, соответственно, у холмогоров и герефордов.

Содержание животных привязное, кормление индивидуальное. Рацион для всех бычков был одинаковым и включал сено злаковое, силос разнотравный и комбикорм (табл. 1). Уровень кормления животных был рассчитан на обеспечение интенсивного выращивания и откорма (2). При этом исходили из принципа нормированного скармливания комбикорма и максимального потребления сена и силоса. Рецепты комбикорма и премикса были аналогичны разработанным для интенсивного выращивания и откорма бычков (3), что дало возможность балансировать рацион по минеральным веществам и витаминам в соответствии с нормами. На долю концентратов приходилось 53-56 % обменной энергии рациона.

Таблица 1. Состав и питательность рациона для бычков

Показатели	Возраст, мес			
	11	12	14	15,5
Комбикорм, кг	3,3	3,6	4,2	5,1
Сено, кг	2,1	2,1	2,4	3,2
Силос, кг	8,0	10,0	10,0	8,0
Кормовые единицы, кг	5,68	6,30	7,33	8,22
Сырой протеин, г	872	1001	1048	1172
Переваримый протеин, г	553	628	700	812
Обменная энергия, МДж	62,05	69,80	80,40	91,20
Сухое вещество, г	6941	7789	9083	9771
Сырая клетчатка, г	1354	1455	1813	1991
Сырой жир, г	268	304	383	391
Сахар, г	225	241	264	297
Крахмал, г	1449	1583	1617	1965

Для контроля за интенсивностью роста бычков взвешивали ежемесячно два дня подряд до утреннего кормления. В 12- и 14-месячном возрасте провели балансовые опыты, а в возрасте 15,5 мес – убой животных с последующей оценкой состава туши.

Для оценки функционального состояния инсулярного аппарата поджелудочной железы определяли в пробах крови базальную (до утреннего кормления) концентрацию инсулина и реакцию эндокринной железы в определенные возрастные периоды в ответ на функциональные нагрузки – прием корма, введение глюкозы и глюкагона. В 12-, 14- и 15,5-месячном возрасте у бычков брали пробы крови пункцией яремной вены до кормления (для определения базального уровня) и через 1 и 3 часа после него. В пробах плазмы крови определяли концентрацию инсулина радиоиммунологическим методом (4), а в пробах цельной крови – содержание глюкозы глюкозооксидазным методом (5).

В возрасте 13,5 месяцев бычкам вводили внутримышечно глюкагон в дозе 10 мкг на кг живой массы и определяли в крови концентрацию инсулина и глюкозы до и через 15, 30, 60, 90 и 120 минут после нагрузки. В 14 месяцев животным была сделана нагрузка глюкозой, которую вводили внутривенно в дозе 0,25 г на кг живой массы. Пробы крови брали до нагрузки и через 15, 30, 60 и 90 минут после нее. В них определяли концентрацию инсулина и глюкозы.

Математическую обработку данных проводили стандартными методами (6).

Результаты и обсуждение

Использованные в эксперименте условия питания обеспечили высокую интенсивность роста бычков. В среднем за весь период опыта среднесуточный прирост массы тела составил 974 ± 15 и 1021 ± 8 г, соответственно, у животных герефордской и холмогорской пород. Прирост живой массы отражал суммарное увеличение основных составных частей тела – костной, мышечной и жировой тканей, а так же массы внутренних органов. В зависимости от генотипа животного, который реализуется с участием эндокринной системы, интенсивность прироста составных частей тела может существенно изменяться. Несмотря на незначительное преимущество в интенсивности роста бычков холмогоров, у них, по данным сотрудников лаборатории белково-аминокислотного питания, была ниже эффективность процессов синтеза мышечных белков и в результате этого меньше среднесуточное накопление мышечной ткани. Эти данные подтверждают результаты оценки состава туши после убоя животных (табл. 2). У бычков мясного направления продуктивности по сравнению с животными молочной по-

роды была достоверно меньше на 18,2 % масса костей, на 17,0 % – количество околопочечного жира и на 4,0 % больше доля мякоти в туше. В результате этого у геррефордов по сравнению с холмогорами на 24,0 % было выше соотношение мякоти и костей в туше, что свидетельствует о большей обмускуленности у них.

Таблица 2. Показатели мясной продуктивности 15,5-месячных бычков

ПОКАЗАТЕЛИ	Геррефорды	Холмогоры
Живая масса, кг	385±3,96	401±7,43
Масса туши, кг	210,2±2,7	215,9±5,6
Убойный выход, %	57,1±0,65	56,5±0,52
Масса мякоти, кг	174,4±2,1	172,3±4,8
Масса костей, кг	35,7±1,62 **	43,66±1,63
Масса внутреннего жира, кг	9,52±0,23	10,38±0,66
Масса околопочечного жира, кг	4,5±0,22 *	5,42±0,17
Доля мякоти в туше, %	83,0±0,65 **	79,8±0,56
Доля костей в туше, %	17,0±0,65 **	20,2±0,56
Соотношение мякоти и костей	4,91±0,23 **	3,96±0,13

Примечание: здесь и далее статистическая значимость различий между группами

животных: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$

Приведенные данные свидетельствуют, что при данных условиях питания и содержания бычков реализовался генотип мясного и молочного направления продуктивности. Это позволило приступить к анализу функционального состояния эндокринной системы в целях изучения межпородных особенностей гормональной регуляции метаболизма.

В системе гомеостатического контроля у жвачных животных важную роль играет инсулин. Проведенные нами ранее исследования на бычках молочных пород показали, что животные с более высокими показателями мясной продуктивности отличались повышенной функциональной активностью инсулярного аппарата. Результаты данной работы не только подтвердили, но и развили этот феномен – в плазме крови 12-мес бычков мясного направления продуктивности (геррефорды) по сравнению с бычками молочного типа (холмогоры) была достоверно выше концентрация инсулина до приема корма и через 3 часа после него (табл. 3). Как известно, инсулин регулирует транспорт глюкозы, аминокислот и свободных жирных кислот в клетки мышечной и жировой ткани. Следовательно, более высокий уровень инсулина в крови животных мясного типа обеспечивает повышенное поступление субстратов в клетки мышечной и жировой ткани и, соответственно,

стимулирует в них интенсивность процессов синтеза белков и липидов, что подтверждают показатели мясной продуктивности.

Таблица 3. Концентрация инсулина в плазме крови 12-мес бычков, мкед/мл

<i>Время взятия крови</i>	Герефорды	Холмогоры
До кормления	7,5±0,72 *	5,1±0,23
Через 1 час	8,8±0,82	8,0±0,55
Через 3 часа	8,9±0,76 *	6,4±0,61

В большинстве исследованных возрастных периодов уровень глюкозы в крови герефордов был достоверно ниже, чем у холмогоров (табл. 4). Вероятно, это является следствием адаптации организма бычков мясного направления продуктивности к повышенному содержанию в крови инсулина. Поступление глюкозы в клетку осуществляется с помощью транспортной системы. Последняя в разных органах и тканях различается по значению константы сродства к глюкозе. Благодаря этому достигается адресная доставка глюкозы в клетки с учетом значимости их физиологической функции и обеспеченности организма глюкозой. Например, транспорт глюкозы в клетки нервной системы может происходить при относительно низком уровне глюкозы в крови и не требует участия в этом процессе инсулина (инсулиннезависимый транспорт). В то же время интенсивность поступления глюкозы в клетки мышечной и жировой ткани регулируется уровнем инсулина в крови (инсулинзависимый транспорт).

Таблица 4. Концентрация глюкозы в крови бычков до приема корма, мг%

Возраст, мес	<i>Порода</i>	
	герефордская	холмогорская
11	65,8±1,7	73,8±1,2
12	68,2±1,66 *	72,2±0,6
13,5	64,8±1,1 *	69,8±1,7
14	60,2±0,97 **	73,2±0,58
14,5	63,0±1,9 *	70,4±1,3
15,5	65,6±2,1	63,2±3,8

Бычки герефордской и холмогорской породы имели разную массу жировых депо. У животных мясного направления было меньше окологепаточного и подкожного жира и больше содержание липидов в мышечной ткани. В результате этого у герефордов наблюдалась характерная для мясных пород «мраморность» мяса, которая является признаком более высоких товарных и пищевых качеств говядины.

Инсулинзависимый транспорт глюкозы в клетки жировой и мышечной ткани осуществляется после взаимодействия инсулина с рецептором на клеточной мембране. Можно предположить, что на клеточной мембране адипоцитов в разных жировых депо имеется разное количество и (или) разная функциональная активность рецептора инсулина. В результате этого при одном уровне глюкозы и инсулина в крови происходит неодинаковое распределение глюкозы между разными жировыми депо.

Гормональная система участвует не только в осуществлении гомеостатического контроля, но и обеспечивает гомеостаз отдельных наиболее важных субстратов, в частности, глюкозы. У жвачных животных количество глюкозы, поступающей в метаболический фонд из желудочно-кишечного тракта, значительно меньше потребностей организма в глюкозе. Поэтому у крупного рогатого скота одним из приоритетных направлений в функционировании регуляторных систем является адекватное обеспечение потребности организма в глюкозе за счет образования ее в процессе глюконеогенеза, преимущественно в клетках печени. Гомеостаз глюкозы при этом достигается в результате гормонального контроля за балансом метаболических потоков – интенсивность использования глюкозы тканями и органами должна соответствовать количеству глюкозы, поступающей в метаболический пул.

Интенсивность глюконеогенеза в клетках печени определяется состоянием «ключевых» ферментов данного метаболического пути – пируваткарбоксилазы, фосфоенолкарбоксикиназы, фруктозо-1,6-дифосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. Синтез и активность этих ферментов контролируют гормоны, например, инсулин тормозит, а глюкокортикоиды повышают (7). Роль глюкокортикоидов в регуляции образования глюкозы наиболее ярко проявляется в экстремальной ситуации при воздействии на организм животных различных стресс-факторов. В этот период в результате увеличения в крови уровня глюкокортикоидов существенно повышается распад мышечных белков. Аминокислоты, образующиеся при этом, направляются в клетки печени, где используются на синтез глюкозы и за счет этого организм животного обеспечивает свои резко возрастающие потребности в глюкозе, что способствует адаптации организма животного к воздействию стресс-факторов. В обычных физиологических ситуациях более важная роль в регуляции углеводного обмена принадлежит глюкагону, который увеличивает поступление в кровь глюкозы за счет активизации процессов глюконеогенеза и гликогенолиза в клетках печени. В целях получения дополнительной информации о роли глюкагона в регуляции углеводного обмена у бычков была проведена функциональная нагрузка этим гормоном. После введения глюкагона в крови животных существенно увеличивалась концентрация глюкозы (табл. 5). У герефордов, по сравнению с холмогорами, медленнее поднимался уровень глюкозы,

но высоким сохранялся более длительное время, что указывает на значительные потенциальные возможности глюконеогенеза у бычков мясного направления.

Таблица 5. Концентрация глюкозы в крови 13,5-месячных бычков после внутримышечной нагрузки глюкагоном, мг %

Время после нагрузки, мин	Герефорды	Холмогоры
0	64,8±1,0	69,8±1,7
15	103,2±12,6	120,6±4,9
30	138,6±7,3	148,8±10,4
60	143,0±10,8 *	97,2±11,0
90	129,0±11,0 *	85,4±8,7
120	106,2±10,4	79,4±2,4

Наряду с увеличением в крови содержания глюкозы, повышению уровня инсулина способствует глюкагон. В настоящее время механизм влияния глюкагона на секрецию инсулина не ясен. Ряд исследователей считают, что повышение концентрации инсулина связано с непосредственным влиянием глюкагона на β -клетки поджелудочной железы, а не опосредовано через изменение содержания глюкозы в крови (8).

Результаты исследований показали, что после нагрузки глюкагоном характер динамики содержания инсулина в крови бычков (табл. 6) был аналогичен изменению концентрации глюкозы. У животных обеих пород концентрация инсулина начинала увеличиваться через 15 минут после нагрузки. Но у герефордов содержание гормона, как и глюкозы, удерживалось более длительное время (90 мин) на высоком уровне.

Таблица 6. Концентрация инсулина в плазме крови бычков после внутримышечной нагрузки глюкагоном, мкед/мл

Время после нагрузки, мин	Порода		% к холмогорам
	герефордская	холмогорская	
0	8,9±1,12	5,9±0,83	149,2
15	39,0±15,50	54,0±4,44	72,2
30	62,3±6,05	52,5±10,89	118,7
60	40,2±4,20	25,2±6,95	159,5
90	41,0±11,11	16,4±2,48	250,0
120	18,7±4,80	9,3±0,92	201,5

Эти данные свидетельствуют, что у бычков мясного направления продуктивности не только поддерживается на высоком уровне базальная секреция инсулина, но и выше функциональные резервы инсу-

лярного аппарата поджелудочной железы. Следовательно, в целях повышения интенсивности биосинтеза основных компонентов мяса белков и липидов у бычков мясного типа целесообразно разрабатывать способы, направленные на более полную реализацию потенциальных возможностей инсулярного аппарата.

Коэффициент корреляции между концентрацией в крови инсулина и глюкозы составил у герефордов $+0,83$ ($P < 0,02$), а у холмогоров $+0,94$ ($P < 0,01$). Наличие существенной положительной зависимости между изменением уровня глюкозы и инсулина после введения глюкагона указывает на возможность опосредованного влияния глюкагона на секрецию инсулина за счет существенного подъема содержания в крови глюкозы. Возможно, если создать условия питания, обеспечивающие увеличение поступления глюкозы в кровь из желудочно-кишечного тракта, можно будет усилить секрецию инсулина и, соответственно, увеличить интенсивность процессов биосинтеза белков и липидов.

Внутривенное введение глюкозы в дозе $0,25$ г на кг живой массы обеспечило через 15 мин существенное увеличение в крови концентрации глюкозы, что в свою очередь привело к достоверному подъему уровня инсулина у бычков обеих пород (табл. 7). В дальнейшем содержание глюкозы снижалось и через 90 минут после инъекции приближалось к исходному уровню. Не установили существенных различий между группами животных по содержанию глюкозы после нагрузки во все исследованные периоды. Следовательно, скорость выведения глюкозы из крови у бычков обеих пород была одинакова.

Показано (9), что в первые минуты после нагрузки глюкозой из β -клеток поджелудочной железы в кровь поступает инсулин, который был ранее синтезирован и отложен во внутриклеточных гранулах. В последующее время высокий уровень инсулина в крови поддерживается за счет повышенного выделения вновь синтезированного инсулина. Согласно данным таблицы 7 уровень инсулина был максимальным через 15 минут после нагрузки и не имел существенных межпородных различий. Эти данные свидетельствуют о том, что на первом этапе после нагрузки глюкозой у бычков обеих пород β -клетки поджелудочной железы выделили в кровь приблизительно равное количество инсулина. Следовательно, несмотря на то, что герефорды по сравнению с холмогорами на протяжении всего опыта поддерживали более высокий базальный уровень инсулина в крови, что предусматривает более интенсивное поступление гормона из железы в кровь, у животных мясного направления продуктивности запасы инсулина в β -клетках сохраняются на таком же высоком уровне, как и у бычков молочных пород.

Таблица 7. Концентрация глюкозы и инсулина в крови бычков после внутривенной нагрузки глюкозой

Порода	Время после введения глюкозы, минуты				
	0	15	30	60	90
	Глюкоза, мг %				
Герефорды	60,2±0,9	136,2±3,5	114,4±4,8	83,0±4,9	70,0±2,8
Холмогоры	73,2±0,8	141,8±7,8	112,0±4,7	80,8±2,9	68,0±4,0
% к холмог.	82,2 ***	96,1	102,1	102,7	100,7
	Инсулин, мкед/мл				
Герефорды	8,6±0,9	49,4±5,1	40,0±4,0	23,4±1,9	14,1±2,6
Холмогоры	6,4±1,3	48,8±6,6	29,6±4,5	11,5±3,4	8,8±1,9
% к холмог.	134,4	101,2	135,1	203,5 *	160,2

Через 30 минут концентрация инсулина в крови бычков герефордской породы сохранялась на высоком уровне, а у животных холмогорской породы начинала быстро снижаться (табл. 7). В результате этого через 60 минут после нагрузки содержание инсулина в крови герефордов была достоверно выше, чем у холмогоров. В этот период уровень инсулина в крови поддерживается преимущественно за счет выделения вновь синтезированного гормона. Следовательно, у бычков герефордской породы потенциальные возможности синтеза инсулина в β -клетках поджелудочной железы выше по сравнению с животными холмогорской породы.

В предыдущих наших работах выдвинута и экспериментально подтверждена идея оценивать напряженность углеводного обмена у жвачных животных по динамике концентрации глюкозы в крови до и после приема корма. Результаты исследований показали, что через час после приема корма содержание глюкозы в крови бычков обеих пород в 12- и 14-месячном возрасте существенно не изменялось по сравнению с исходным уровнем (табл. 8). Это свидетельствует о том, что система гомеостатического контроля при данных условиях питания способна обеспечить гомеостаз глюкозы у бычков обеих пород на фоне высоких параметров накопления мышечной и жировой тканей.

Таблица 8. Концентрация глюкозы в крови бычков до и после приема корма, мг%

Порода	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
	12-месячный возраст		
Герефордская	68,2 ± 1,66 *	71,0 ± 1,38	69,0 ± 1,5
Холмогорская	72,2 ± 0,6	71,0 ± 2,10	73,2±2,3
	14-месячный возраст		
Герефордская	63,0 ± 1,9 **	63,2 ± 2,1	66,0 ± 3,1
Холмогорская	70,4 ± 1,3	68,4 ± 1,8	67,2 ± 1,8
	15,5-месячный возраст		

Герефордская	65,6 ± 2,8	53,8 ± 2,1	58,2 ± 1,1
Холмогорская	63,2 ± 3,8	58,8 ± 1,3	58,6 ± 0,5

В 15,5-месячном возрасте через час после приема корма у животных обеих пород наблюдалось достоверное снижение концентрации глюкозы в крови. Это свидетельствует о том, что поток поступления глюкозы в ее обменный пул значительно меньше потока использования глюкозы для обеспечения потребностей организма. В этот период система гомеостатического контроля не смогла обеспечить состояние гомеостаза глюкозы при данных условиях питания. В период заключительного откорма изменяется соотношение между составными частями прироста живой массы – снижается доля накопления мышечной ткани и увеличивается резервирование субстратов в жировых депо. Усиление процессов липогенеза требует дополнительного использования глюкозы. Поэтому в 15,5-месячном возрасте через 1 и 3 часа после приема корма обмен веществ протекал в условиях усиления напряженности метаболизма углеводов.

В целом проведенные исследования свидетельствуют о том, что эффективность биоконверсии питательных веществ корма в основные компоненты мяса белки и липиды у молодняка крупного рогатого скота при одинаковых условиях питания в значительной мере определяются генотипом животного, который реализуется в разной функциональной активности регуляторных систем. Последние контролируют интенсивность и направленность метаболических потоков в организме растущих животных для обеспечения основных физиологических функций и, в том числе, формирование мышечной и жировой ткани. Полученные данные показали, что в системе гомеостатического контроля у жвачных животных ведущую роль играет инсулин. Бычки мясного направления продуктивности отличаются более высокой функциональной активностью инсулярного аппарата поджелудочной железы, что в конечном итоге способствует увеличению обмускуленности туши и получению говядины высокого качества. Результаты оценки гормональной системы с помощью функциональных нагрузок свидетельствуют о наличии существенных резервов в синтезе и секреции инсулина у молодняка крупного рогатого скота, особенно у животных герефордской породы. Эти данные являются теоретической основой для разработки новых способов управления процессами биосинтеза белков и липидов при выращивании и откорме бычков, так как они свидетельствуют о целесообразности создания условий для более полной реализации резервов инсулярного аппарата поджелудочной железы, а не о введении экзогенного инсулина. Планируется в дальнейшем исследовать влияние факторов питания на функцию инсулярного аппарата в целях разработки способа повышения секреции инсулина в определенные периоды выращивания и откорма бычков, что позволит увеличить интенсив-

ность биосинтеза белков и липидов и, соответственно, повысить эффективность производства говядины.

Выводы

1. Генотип молодняка крупного рогатого скота мясного направления реализуется в изменении активности регуляторных систем организма и, в первую очередь, в повышении функциональной активности инсулярного аппарата поджелудочной железы. При одинаковых условиях питания животных высокий уровень инсулина в плазме крови бычков мясного направления продуктивности повышает интенсивность процессов биосинтеза белков и липидов в мышечной ткани за счет более эффективного обеспечения их субстратами, что способствует получению говядины высокого качества.

2. Прижизненная оценка мясной продуктивности бычков по величине прироста живой массы не всегда адекватно отражает состав тела. Животные мясного направления, при отсутствии достоверных различий с бычками молочной породы по живой массе, имели в туше больше долю мякоти и меньше костей, выше отношение мякотной части к костям и мякоти к жиру при более низких затратах питательных веществ корма на единицу продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Матвеев В.А., Галочкина В.П., Ельченинов Г.М., Кальницкий Б.Д. и др. Уровень гормонов и обмен веществ у растущих бычков. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сборник научных трудов ВНИИФБиП с.-х. жив., Боровск, 1999, 38: 173-183.
2. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. Под ред. А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова, В.Н. Баканова и др. М.: Агропромиздат, 1985: 352.
3. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971: 30.
4. Радченков В.П. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. (Методические указания). Боровск, 1985.
5. Радченков В.П., Матвеев В.А., Аверин В.С. и др. Определение потенциала функции инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота (Методические указания). Боровск, 1986: 9.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биологич. спец. вузов. М.: Высш. школа, 1980: 293.

7. Weber G., Singhal R.L., Srivastava S.K. Effect of nutritional state on hormonal regulation of liver enzymes. *Canadian Journal of Biochemistry*, 1965, 43, 9: 1549-1563.
8. Gerich J.E., Charles M.A., Grodsky G.M. Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion. *Annual Review of Physiology*, 1976, 38: 353-388.
9. Баранов В.Г., Тихонова Н.Е. Инсулин. Физиология эндокринной системы. Л.: Наука, 1979: 220-239.
10. Basset J.M. Endocrine factors in the control of nutrient utilization: ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, 1978, 37, 3: 273 –280.
11. Weekes T.E.C. Insulin and growth. *Control and Manipulation of Animal Growth*. Ed. P.J. Buttery, D.B. Lindsay, N.B. Haynes. London: Butterworths, 1986: 187- 206.

**НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И СОСТОЯНИЕ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БЫЧКОВ НА ОТКОРМЕ ПРИ
РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ СУБСТРАТАМИ
ПРОЦЕССОВ БИОСИНТЕЗА КОМПОНЕНТОВ МЯСА**

В.А. Галочкин, В.Ф. Сухих, О.В. Софронова
Лаборатория иммунобиотехнологии

Описана реакция иммунной системы откармливаемых бычков по ряду критериев: концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови, активности лизоцима, β -лизинов и общей бактерицидной активности при скармливании им препарата вирулентных мутантов лизогенного бактериофага (стрептофагина), избирательно ингибирующего амилитическую активность микрофлоры рубца и изменяющего соотношение летучих жирных кислот, являющихся основными субстратами для биосинтеза компонентов мяса у жвачных.

Введение

Задачей исследований лаборатории иммунобиотехнологии по разделу комплексной тематики института было дать характеристику функционального состояния иммунной системы и неспецифической резистентности организма бычков на откорме при испытании различных методов направленной регуляции процессов образования субстратов в желудочно-кишечном тракте и возникающей вследствие этого разной степени обеспеченности субстратами биосинтетических процессов.

Интенсивность роста молодняка животных определяет множество факторов и условий. Наряду с хорошо изученными факторами кормления и содержания функционируют тонкие физиологические меха-

низмы, способствующие поддержанию динамического гомеостаза основных биохимических параметров организма животного, что и является главным условием высокой продуктивности. Из числа внутренних механизмов высокой продуктивности широко исследуются гормональная регуляция и иммунологическое обеспечение процессов роста и развития молодняка сельскохозяйственных животных. В научных публикациях есть сведения о положительной коррелятивной зависимости между скоростью роста животных и ферментативной активностью лизоцима в сыворотке крови, а также между иммунологическими показателями и некоторыми онтогенетическими признаками домашних животных. В литературе также описаны факты, подтверждающие зависимость общего состояния защитных сил организма от величины суммарной бактерицидной активности крови (1-5).

В предыдущих исследованиях нами было изучено функциональное состояние иммунной системы и отдельных звеньев неспецифической резистентности у бычков молочных и мясных пород при различной скорости роста животных. Наиболее определенная связь между интенсивностью роста животных и иммунологической характеристикой метаболических процессов прослеживалась при анализе активности системы лизоцима.

На основании обобщения данных, полученных в институте в предшествующих исследованиях, была выдвинута и частично подтверждена экспериментально концепция о метаболических типах продуктивных животных, которая базируется на фундаментальных закономерностях в области физиологии и биохимии и, в частности, учитывает основные положения теории гомеостатического контроля метаболизма у животных. Генетический же потенциал животных реализуется через различную активность нервной, эндокринной и иммунной систем, что в совокупности приводит в организме животных к изменению интенсивности и направленности метаболических потоков, вызывающих, в свою очередь, различия в продуктивности, качестве получаемой продукции и эффективности биоконверсии питательных веществ корма в продукцию.

Исходная посылка для аргументации проведения комплексных работ заключалась в том, что, воздействуя на процессы ферментации в рубце, можно влиять на метаболическую направленность обмена веществ в организме. Веществами, меняющими ферментативные процессы в рубце, могут быть пробиотики, к которым в настоящее время проявляют все возрастающий интерес.

В последнее десятилетие группу биологических стимуляторов продуктивности сельскохозяйственных животных расширили вирулентные мутанты бактериофагов, выделенные из пищеварительного тракта животных. При скармливании их жвачным животным в рубце повышается как общее число микроорганизмов, так и число бактерий,

гидролизующих целлюлозу и пектин, и увеличивается концентрация сахара и летучих жирных кислот, т. е. в начальном этапе пищеварения создаются условия для повышения переваримости сложных полисахаридов грубого корма. Это позволяет снизить в рационе животных уровень зерновых концентратов и повысить потребление сена и силоса, что приводит к снижению себестоимости продукции животноводства.

Один из таких препаратов, разработанных в институте, был испытан в данном опыте – пробиотик стрептофагин, содержащий бактериофаги, лизирующие чувствительные к ним штаммы амилитических стрептококков рубца жвачных. При его скармливании на фоне высококонцентратных рационов снижается количество крахмаллизующих бактерий, утилизирующих целлобиозу, являющуюся основным продуктом гидролиза целлюлозы. В результате этого при практически постоянном суммарном содержании летучих жирных кислот в содержимом рубца снижается доля ацетата и повышается содержание других кислот (особенно пропионата), а также снижается сбраживание легкорастворимых углеводов корма в преджелудках и увеличивается поступление крахмала в кишечник и расщепление его там до глюкозы.

На основании изложенного планировалось с помощью указанного пробиотика изменить интенсивность поступления из желудочно-кишечного тракта в метаболический пул основных субстратов и, соответственно, повысить эффективность биосинтеза белка и липидов у растущих бычков и показать возможность управляемого регулирования направленности метаболических потоков.

Более узкая и конкретная задача лаборатории иммунобиотехнологии состояла в изучении иммунологического профиля и элементов неспецифической резистентности у растущих и откармливаемых бычков в связи со скармливанием им препарата вирулентных мутантов лизогенного бактериофага (стрептофагина), специфического для пищеварительной системы жвачных.

Материал и методы

Работа выполнена в виварии института на 8 бычках холмогорской породы в период доращивания и откорма животных. Вследствие необходимости классификации экспериментального материала, длительный период откорма условно разделили на три стадии: стадия доращивания, стадия откорма и заключительная стадия откорма. Каждая из этих стадий отличалась объективными возрастными и климатическими характеристиками: возраст бычков, их масса, среднесуточный прирост, сезон года, температура окружающей среды. Кормление осуществляли по рекомендуемым нормам РАСХН и варьировали в соответствии с возрастом животных, рассчитывая на продуктивность 1000 г

среднесуточного прироста живой массы у 300 – 400-килограммовых животных.

В качестве критериев иммунологического состояния организма использовали концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови, активность лизоцима, β -лизинов и общую бактерицидную активность. Активность лизоцима определяли используя в качестве тест-культуры *Micrococcus lysodeikticus* (5), активность β -лизинов с помощью *Bacillus subtilis* (6) и общую бактерицидную активность по степени задержки роста культуры *Escherichia coli* в среде, содержащей сыворотку крови подопытных животных. Иммуноглобулины класса G определяли методом простой радиальной иммунодиффузии по Манчини (7).

Бактериофаги для скармливания животным готовили в лаборатории биотехнологии микроорганизмов. С этой целью фаги VM 6/6, VM 32/6, VM 28/28 и VM 54/54 смешивали в равных объемах и ежедневно задавали бычкам опытной группы в дозе 25 мл. Средний титр фагов в препарате в период опыта составил $2,96 \times 10^{10}$ частиц в миллилитре. Животным контрольной группы ежедневно давали 25 мл стерильной желатиновой среды, которую использовали для приготовления бактериофагов. Экспериментальный материал обрабатывали статистически с применением критериев Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как следствие применения бактериофага, приблизительно при равной интенсивности роста и общего веса туши в обеих группах, у животных опытной группы увеличилось отложение мышечной массы. Количество мякоти в туше повысилось на 2,15 %, а количество костей снизилось на 7,23%. В результате мышечная масса туши увеличилась на 2,41%. Эти изменения происходили при более высокой оплате корма по кормовым единицам на 8,5%, по переваримому протеину на 5,9%, по обменной энергии на 4,2% и по органическому веществу на 6,14%.

Как видно из данных таблицы 1 общая бактерицидная активность крови бычков опытной группы составила $42,4 \pm 1,8$ % на 57-й день скармливания препарата стрептофагина и $45,0 \pm 0,7$ % на 84-й день скармливания, тогда как у контрольной группы – $41,4 \pm 1,4$ % на 57-й день и $41,6 \pm 0,9$ % на 84-й день скармливания, что свидетельствует о тенденции к повышению до 10,8 %.

В этой же таблице представлены показатели активности лизоцима в сыворотке крови бычков, которые в опытной группе составили $17,0 \pm 0,4$ % на стадии откорма и $19,0 \pm 0,7$ % на заключительной стадии откорма, а в контрольной группе – $12,0 \pm 1,2$ % на 57-й день откорма и $12,0 \pm 0,5$ % на 84-й день откорма соответственно. Активность лизоцима

после скармливания препарата стрептофагина имела тенденцию к повышению до 16%.

Концентрация иммуноглобулинов класса G в крови подопытных бычков (таблица 1) составила $14,3 \pm 0,2$ мг/мл на 57-й день скармливания препарата и $15,2 \pm 0,3$ мг/мл на 84-й день откорма, а у бычков контрольной группы - $13,4 \pm 0,1$ мг/мл на стадии откорма и $13,6 \pm 0,1$ мг/мл на заключительной стадии откорма соответственно, что также выше контроля на 11,3%.

Активность β -лизиновой фракции в контрольной и опытной группах существенно не изменялась в продолжение всего опыта. Общая бактерицидная активность крови и активность лизоцима в сыворотке крови бычков после скармливания препарата стрептофагина имели тенденцию к повышению: до 10,8% в случае общей бактерицидной активности и до 16% для лизоцима. В сыворотке крови контрольных животных наблюдали незначительное повышение уровня лизоцима и общей бактерицидной активности.

Концентрация иммуноглобулина класса G в крови подопытных бычков была также выше контроля на 11,3%. Активность β -лизиновой субстанции крови в продолжение опыта существенно не изменялась, что свидетельствует о слабой изменчивости элементов β -лизиновой системы в иммунофункциональном гомеостазе организма животных.

Таблица 1. Общая бактерицидная активность, уровень активности лизоцима, концентрация иммуноглобулинов класса G и уровень активности β-лизинов сыворотки крови бычков после скармливания препарата стрептофагина

№№ живот ных	Стадия дорашивания (перед скармливанием препарата)				Стадия откорма (57-й день скармливания препарата)				Заключительная стадия откорма (84-й день скармливания препарата)			
	общая бакте- рицид- ная актив- ность, %	актив- ность лизоци- ма, %	концен- трация имму- но- глобу- линов G, мг/мл	актив- ность β- лизинов, %	общая бакте- рицид- ная актив- ность, %	актив- ность лизоци- ма, %	концен- трация имму- но- глобу- линов G, мг/мл	актив- ность β- лизинов, %	общая бакте- рицид- ная актив- ность, %	актив- ность лизоци- ма, %	кон- цент- рация имуног- лобули- нов G, мг/мл	актив- ность β- лизинов, %
Контрольная группа												
445	37,4	12	13,3	20,1	37,8	11	13,5	19,2	38,4	11	13,6	21,0
473	39,3	11	13,8	17,3	40,3	13	13,6	19,1	39,1	12	13,6	21,4
371	39,7	10	12,8	20,2	43,7	11	13,1	21,3	44,2	13	13,6	19,7
433	38,5	11	13,1	18,4	43,9	13	13,3	18,8	44,7	13	13,7	19,9
М±м	38,7±0,5	11±0,4	13,3±0,2	19,0±0,7	41,4±1,4	12,0±1,2	13,4±0,1	19,6±0,6	41,6±0,9	12,0±0,5	13,6±0,1	20,5±0,4
Опытная группа												
449	39,7	12	13,7	20,7	42,8	17	14,3	18,8	44,9	19	14,8	19,4
475	38,3	12	13,9	18,3	45,3	16	14,7	18,7	46,1	16	15,3	19,8
511	39,8	12	12,9	18,8	44,4	18	13,7	18,1	45,9	21	14,7	20,2
481	37,2	11	12,8	17,4	37,2	17	14,4	17,9	43,2	20	15,9	18,9
М±м	38,8±0,6	12,0±0,1	13,3±0,3	18,8±0,7	42,4±1,8	17,0±0,4	14,3±0,2	18,4±0,2	45,0±0,7	19,0±0,7	15,2±0,3	19,6±0,3

Заклучение

Общий итог работы состоит в том, что длительное скармливание препарата вирулентных мутантов лизогенного бактериофага бычкам в период дорастивания и откорма изменяет параметры иммунологического профиля организма бычков в соответствии с изменением количественных характеристик мясной продуктивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тараканов Б.В. Микробиологические процессы в рубце и эффективность применения нового биопрепарата стрептофагина в кормлении лактирующих коров. Сельскохозяйственная биология, 1993, 6: 94-95.
2. Тараканов Б.В. Регуляция микробиологических процессов в рубце жвачных животных бактериофагами *Streptococcus bovis*. Микробиология, 1994, 63, 4: 657-667.
3. Моргунов И.Н., Супоницкая В.И. Гуморальные факторы иммунологической реактивности организма. Киев, 1975.
4. Берестов В.А., Малинина Г.М. Особенности неспецифического иммунитета у норок и песцов. Ленинград, 1991.
5. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом. Лабораторное дело, 1968, 1: 28.
6. Бухарин О.В., Фролов В.А., Луда А.П. Ускоренный метод определения β -лизинов в сыворотке крови. Микробиология, эпидемиология и иммунология, 1972, 9: 42.
7. Бем Э. Простая радиальная иммунодиффузия по Манчини. Иммунологические методы. М.: Мир, 1987: 49-57.

УЧАСТИЕ АМИНОКИСЛОТ В РЕГУЛЯЦИИ МЕЖУТОЧНОГО ОБМЕНА ТЕЛЯТ

Л.В. Харитонов, В.А. Матвеев, О.В. Харитонова

Лаборатории белково-аминокислотного питания и эндокринной регуляции обмена веществ

Изучено влияние ряда аминокислот на уровень выделения гормонов и азотистый обмен у телят-молочников. Установлено, что пероральное введение глицина, глутамата или β -аланина повышало уровень кортизола, глюкозы и некоторых свободных аминокислот в крови телят. Длительное выпаивание смеси лейцина, лизина и валина привело к увеличению в крови содержания инсулина и мочевины при снижении концентрации глюкозы и суммы свободных аминокислот. Смесь на основе глутамина (+глутамат + аспарат) снижала уровень глюкозы, мочевины и свободных аминокислот при одновременном уменьшении

концентрации инсулина в крови. Обе смеси аминокислот улучшали использование азота корма организмом животных, повышали интенсивность прироста массы тела и накопление мышечной ткани.

Введение

Белковое питание животных, как известно, сводится в основном к превращению в организме аминокислот, которые поступают из пищеварительного тракта или образуются при расщеплении белков тела. Эти аминокислоты служат пластическим и энергетическим материалом для жизнедеятельности организма, например, для синтеза белка, ряда важнейших азотистых и безазотистых соединений.

Исследования последних лет (4, 6, 10, 16) показали, что аминокислоты, наряду с другими метаболитами (2, 13, 20), играют важную роль в регуляции процессов пищеварения и межклеточного обмена. Ряд аминокислот оказывают свое воздействие через стимуляцию выделения желудочно-кишечных гормонов и гормонов «общего» действия. Так, внутривенное введение больших доз аргинина, гистидина, лизина и фенилаланина приводило к значительному повышению уровня соматотропина в крови (1, 5). Большинство авторов считают, что аминокислоты усиливают секрецию гормона роста не непосредственно, а через инсулин, образование которого значительно увеличивается под влиянием вводимых аминокислот. Изучение влияния лейцина на синтез и освобождение инсулина экспериментально подтвердило, что аминокислоты непосредственно стимулируют образование этого гормона.

Шамберев Ю.Н. и сопр. (16, 17) установили, что лизин, гистидин и аргинин являются индукторами эндогенного инсулина и соматотропина у молодняка крупного рогатого скота и использовали это свойство аминокислот для стимуляции анаболических процессов и роста животных. Заменимые аминокислоты изучены в этом отношении в меньшей степени. Известно, что часть из них (глицин, серин, глутамат, аспартат, таурин, γ -аминомасляная кислота и пролин) входят в группу медиаторных аминокислот и служат передатчиками импульсов в сигналах центральной и вегетативной нервной системы (10). При внутривенном введении аланина увеличивался уровень глюкагона в крови овец (22). Дикарбоновые аминокислоты – аспарагиновая и глутаминовая в подобных условиях стимулировали гипофиз-адреналовую систему и тормозили желудочную секрецию (18). Приводятся данные о том, что глицин является веществом, стимулирующим высвобождение гормона роста и применяется при лечении пониженной функции гипофиза и гипогликемии, поскольку увеличивает выделение глюкагона, мобилизующего гликоген (12).

В последние годы пристальное внимание исследователей обращено на изучение свойств глутамина как регулятора процессов синтеза и распада белков в организме, в частности, в мышцах (21, 23). Выявленные закономерности легли в основу разработки диет и пищевых добавок для спортсменов (24). Применительно к сельскохозяйственным животным, и в частности, к молодняку крупного рогатого скота молочного периода выращивания, вопросы участия аминокислот в регуляции межклеточного обмена изучены недостаточно. В связи с этим, основной целью наших исследований было выяснить влияние отдельных аминокислот и их смесей на уровень гормонов и некоторых метаболитов в крови телят-молочников, а также эффективность использования протеина корма организмом этих животных.

Полученные результаты исследований позволят уточнить участие аминокислот в регуляции выделения эндогенных гормонов и обосновать использование препаратов аминокислот для направленного воздействия на животных с целью повышения продуктивности, уточнения норм аминокислотного питания.

Материал и методы

Для реализации поставленной задачи было проведено две серии опытов в условиях вивария института на телятах-молочниках (9 голов). Кормили телят по схеме, предусматривающей выпаивание 6-7 литров молока в сутки, с 10-дневного до 2-месячного возраста. Содержали животных в индивидуальных клетках, оборудованных поддонами для сбора мочи.

В первой серии опытов телятам задавали растворы отдельных аминокислот или их смеси, а в контроле – воду. Доза аминокислот составляла в среднем 0,05 моля. Растворы или воду выпаивали через 8-10 мин после скармливания молока, чтобы избежать возможного влияния вводимых веществ на интенсивность начального этапа створаживания молока в сычуге. Вместе с тем, стремились создать в кишечнике повышенный уровень свободных аминокислот до начала интенсивного появления их в результате гидролиза молочных белков в желудочно-кишечном тракте. Испытывали глицин, глутамат, аспартат, β -аланин и их смеси, а также смеси на основе лейцина. Кровь для анализа брали до введения аминокислот и через 1 и 3 часа после него.

Вторая серия опытов включала два балансовых опыта с промежутком 10 дней. В I периоде получены исходные данные по переваримости протеина корма и отложению азота, а также выделению с мочой креатинина для вычисления креатининового индекса, характеризующего количество мышечной ткани в расчете на кг массы тела. Затем в течение 15 дней телятам два раза в день выпаивали растворы аминокис-

лот: 2-й группе – смесь лейцина, лизина и валина; животным 3-й группы – смесь глутамина, глутамата и аспартата. Телята 1-й группы служили контролем и получали воду в равном объеме с опытными растворами. Применение аминокислот продолжали и в период второго балансового опыта.

Анализ молока, кала и мочи на содержание общего азота проводили методом Къельдаля, концентрацию креатинина в моче определяли методом Поппера, глюкозу в крови анализировали глюкозооксидазным методом, мочевины – с диацетилмоноксимом, свободные аминокислоты в цельной крови – на аминокислотном анализаторе после осаждения белков раствором сульфосалициловой кислоты; гормоны (инсулин, кортизол, трийодтиронин, тироксин) – радиоиммунологическим методом (3, 9 11). Для статистической обработки использован метод оценки достоверности разности средних в динамике на одной группе животных (метод парных сравнений)(7).

Результаты и обсуждение

Установлено, что у 10-дневных телят уровень изучаемых гормонов в крови находился в определенной связи с содержанием глюкозы и свободных аминокислот (% от суммы), при этом величина коэффициента корреляции и его знак менялись в динамике после кормления. До кормления концентрация инсулина и трийодтиронина имела выраженную отрицательную корреляцию с содержанием в крови телят глутамата, лейцина, тирозина и фенилаланина. Показатель кортизола положительно коррелировал с уровнем глюкозы и свободных аминокислот в крови, содержанием глутамина, валина, фенилаланина. Отрицательная корреляция отмечена с концентрацией таурина, треонина, изолейцина, лейцина и фенилаланина.

В пробах крови, взятых у телят через 3 часа после кормления молоком (2 л), корреляционные связи между основными показателями несколько изменились. Снизился коэффициент корреляции между инсулином и трийодтироном с 0,722 ($P < 0,05$) до 0,277 ($P > 0,05$), а между кортизолом и тироксином связь стала отрицательной ($r = -0,680$ вместо $r = +0,390$).

Уровень инсулина имел выраженную отрицательную корреляцию с содержанием метионина, тирозина, глицина, фенилаланина, гистидина и лизина в крови, кортизол – в основном с лизином и валином, трийодтиронин – с глутаматом, орнитинном, гистидином и аргинином, тироксин отрицательно коррелировал с глутаматом и тирозином.

Концентрация свободных аминокислот крови формируется в этот период у телят за счет различных источников: с одной стороны, за счет всасывания из пищеварительного тракта, протеолиза «подвиж-

ных» белков и пептидов и поступления из тканей; с другой стороны – за счет изменения интенсивности глюконеогенеза и синтеза белка и других азотистых соединений, предшественниками которых являются свободные аминокислоты. При этом может меняться взаимоотношение между гормонами и частично изменяться их функция. Так, при высоком уровне соматотропина в крови, инсулин может «переключать» свое действие с углеводного обмена в большей степени в сторону белкового обмена (1).

При введении телятам растворов глицина и β -аланина произошло снижение уровня инсулина и трийодтиронина и повышение концентрации кортизола и тироксина в крови телят (через 1 час) по сравнению с контролем (табл. 1). Влияние глицина и β -аланина было однонаправленным, хотя и выражено в большей степени у глицина. Это касается и изменения уровня глюкозы и свободных аминокислот в крови, показатель которых увеличивался (табл. 2)

Таблица 1. Концентрация гормонов в крови телят через 1 час после кормления и введения аминокислот (нг/мл)

Гормоны	Введенные аминокислоты		
	контроль	глицин	β -аланин
Инсулин	2,28	1,22±0,30	1,74±0,26
Кортизол	4,10	7,72±0,64	6,69±0,59
Трийодтиронин	4,60	2,96±0,17	3,32±0,16
Тироксин	36,9	52,2±14,0	50,1±19,8

Можно предполагать, что повышение уровня этих метаболитов в крови после введения глицина и β -аланина связано как с усилением всасывания глюкозы и аминокислот из кишечника (11), так и с расщеплением гликогена под влиянием глюкагона, выделение которого стимулирует, в частности, глицин (12). Нельзя исключать при этом усиления глюконеогенеза под влиянием повышенного уровня кортизола и снижения использования глюкозы тканями организма в связи с уменьшением содержания инсулина.

Таблица 2. Уровень глюкозы и свободных аминокислот в крови телят после кормления и введения аминокислот (мг%)

Введенные аминокислоты	Глюкоза			Свободные аминокислоты		
	до введения	через 1 час	через 3 часа	до введения	через 1 час	через 3 часа
Контроль (вода)	62,0	72,7	73,7	33,04	30,95	28,64
Глицин	56,7	81,0	85,3	29,36	31,89	30,89

β-аланин	60,3	79,3	83,7	32,54	33,37	31,75
----------	------	------	------	-------	-------	-------

Сходные изменения концентрации изучаемых метаболитов в крови телят при введении глицина наблюдались в опыте, когда его влияние сравнивалось с действием глутамата и аспартата. Глутамат и аспартат, после их выпаивания телятам, приводили к увеличению концентрации свободных аминокислот и глюкозы в крови при снижении содержания мочевины. При этом отмечалось повышение доли глутамина, таурина и лейцина при уменьшении этого показателя для основного ряда аминокислот. Введение смеси глутамата, глицина и цистеина, имитирующей состав глутатиона, привело к заметному увеличению в крови содержания свободных аминокислот, вероятно, за счет усиления их всасывания в кишечнике. Этим свойством, как известно, обладают и глутатион, и глицин (11). При этом содержание глюкозы в крови также увеличилось.

Вторая серия опытов была посвящена более подробному изучению воздействия на выделение гормонов и межклеточный обмен у телят смесей аминокислот на основе лейцина (+лизин + валин) и глутамина (+ глутамат + аспартат). Входящие в состав «лейциновой» смеси лейцин, лизин и валин, как известно, являются аминокислотами, лимитирующими синтез мышечного белка, поэтому их включение в применяемую смесь предположительно должно было оказать влияние на интенсивность накопления мышечной ткани у растущих телят. Смесь глутамата и аспартата, изученная ранее, была дополнена глутамином, превращения которого самым тесным образом связаны с дикарбоновыми аминокислотами. Как уже отмечалось выше, в последние годы выявлено регулирующее действие глутамина в процессах синтеза мышечных белков (21, 23). Эти опыты выполнены в основном на лабораторных животных. В других исследованиях (24) отмечено стимулирующее влияние заданного *per os* глутамина на устойчивость эритроцитов к проникновению микроорганизмов из кишечника, а также повышение образования антител в организме животных. Учитывая, что воздействие глутамина и его предшественников на межклеточный обмен и выделение гормонов у молодняка жвачных не изучалось, возникла необходимость в проведении таких экспериментов.

В отличие от I серии опытов, препараты аминокислот задавали в течение 15 дней, два раза в день, равными порциями, через 8-10 мин после выпаивания молока. В предварительный период (до применения аминокислот) не отмечено существенных различий между группами животных в показателях крови, отложении азота и приросте массы тела. В конце опытного периода через 3 часа после кормления телят молоком и введения «лейциновой» смеси аминокислот наблюдалось повышение уровня инсулина (+8,2%) и мочевины (+28,2%) в крови телят и снижение содержания глюкозы (-24,6%), а также незначительное

уменьшение концентрации свободных аминокислот, в основном за счет таурина, аспартата, треонина, изолейцина, гистидина и аргинина (табл. 3). Смесь глутамина, глутамата и аспартата снизила в крови телят концентрацию глюкозы (-16,8%) и мочевины (-13,6%) при одновременном уменьшении содержания инсулина. Отмечено некоторое возрастание относительного содержания ряда незаменимых аминокислот (валин, изолейцин, лейцин, лизин, гистидин).

Таблица 3. Уровень инсулина и метаболитов в крови телят через 3 часа после введения смеси аминокислот

Показатели	Контроль	Лейцин + лизин + валин	Глутамин + глутамат + аспартат
Инсулин, пг/мл	1170±85	1268±77	870±56*
Глюкоза, мг% ,	114±5	86±7*	95±6*
Мочевина, мг%	16,0±1,3	20,5±0,6	13,8±0,7
Сумма свободных аминокислот, мг%	43,8±0,3	42,6±0,4	41,6±0,7
Свободные аминокислоты, % от суммы:			
таурин	7,38±0,93	5,11±0,32	5,82±0,39
аспарагиновая к-та	7,39±0,21	6,41±0,27*	8,53±0,33*
треонин	5,25±0,25	3,82±0,28*	5,18±0,19
серин	2,09±0,09	2,53±0,25	2,05±0,10
глутаминовая к-та	6,87±0,48	6,65±0,43	7,83±0,33
глутамин	13,26±0,48	13,47±0,51	14,83±0,49*
глицин	11,22±0,46	11,15±0,97	8,39±1,03*
аланин	4,04±0,14	3,68±0,30	3,88±0,19
цитрулин	1,60±0,21	2,06±0,21	1,16±0,11
валин	3,82±0,22	5,23±0,17*	4,00±0,23
метионин	1,70±0,07	1,98±0,12	1,53±0,11
изолейцин	2,93±0,09	2,60±0,32	3,46±0,29
лейцин	2,91±0,10	4,76±0,24*	3,30±0,19
тирозин	2,40±0,28	2,56±0,23	2,53±0,13
фенилаланин	2,34±0,17	2,17±0,23	2,38±0,11
орнитин	2,86±0,18	3,00±0,15	2,77±0,17
лизин	4,48±0,18	6,66±0,47*	4,73±0,09
1-метилгистидин	5,89±0,23	5,76±0,16	6,48±0,14*
гистидин	6,67±0,13	6,21±0,09	7,05±0,12*
аргинин	4,90±0,37	4,18±0,31	4,07±0,15

Примечание: * – здесь и далее в таблицах – достоверно при P < 0,05

Можно полагать, что введение телятам «лейциновой» смеси способствовало образованию белка в организме, что и привело к снижению уровня важнейших незаменимых аминокислот и глюкозы в крови. При этом не исключается и воздействие некоторого избытка лейцина, лизина и валина в крови после всасывания этих аминокислот из кишечника, о чем можно судить по повышению концентрации мочевины,

являющейся конечным продуктом азотистого обмена, и снижению доли аргинина и аспартата, участвующих в обезвреживании аммиака в организме. «Глутаминовая» смесь снижала использование незаменимых аминокислот в глюконеогенезе и несколько усиливала превращение в этих реакциях глицина, а также возможно глутамата и аспартата.

В балансовом опыте установлено положительное влияние обеих смесей аминокислот на отложение азота корма в организме животных, которое по сравнению с контролем увеличилось на 6,3 и 7,2% соответственно в «лейциновой» и «глутаминовой» группах телят (табл. 4). С отложением азота тесно коррелировал прирост массы тела за период опыта, хотя этот показатель носил ориентировочный характер, поскольку получен за ограниченный период. Интенсивность прироста массы тела в опытных группах была выше в среднем на 5,6 и 7,8% по сравнению с контролем. В этих же группах у животных был более высоким креатининовый индекс (+6,3 и +12,6% к контролю), характеризующий массу мышечной ткани в теле животных (табл. 5). Увеличение этого показателя по сравнению с предварительным периодом было также более выражено у телят опытных групп.

Таблица 4. Баланс азота и прирост массы тела у телят при введении смесей аминокислот

Показатели	Группы		
	1-я контрольная	2-я лейциновая	3-я глутаминовая
Принято с кормом, г	40,60±0	42,10±0,80	41,80±0,70
в т.ч. с добавкой	–	1,20	0,90
Переварилось:			
г	38,94±0,34	41,00±0,51	40,70±0,62
% от принятого	95,9	97,4	98,1
Отложилось в теле:			
г	29,92±0,28	31,80±0,56*	32,07±0,61*
% от принятого	73,4	75,5	77,3
% от переваренного	76,8	77,6	78,8
Среднесуточный прирост, г	688±28	718±17	731±23
Интенсивность прироста, %	35,6±0,9	37,6±0,8	38,4±1,2

Таблица 5. Выделение креатинина с мочой у телят в период балансовых опытов

Группы телят	I балансовый опыт		II балансовый опыт		Креатинин, г/сут/гол, II опыт к I
	креатинин, г/сут/гол	креатинин. индекс г/кг массы тела	креатинин, г/сут/гол	креатинин. индекс г/кг массы тела	
1 (контроль)	1,58±0,95	27,7	2,03±0,08	31,6	+0,45
2 (лейциновая)	1,65±0,16	28,5	2,20±0,09	33,6	+0,55
3 (глутаминовая)	1,68±0,12	29,0	2,31±0,07	35,7	+0,63

Таким образом, обе вводимые смеси аминокислот способствовали лучшему использованию питательных веществ молока, и в первую очередь аминокислот, организмом телят для биосинтетических целей. В то же время прослеживаются определенные различия в действии изучаемых аминокислотных композиций. «Лейциновая» смесь стимулировала выделение инсулина, являющегося одним из гормонов анаболического действия. При этом в ткани доставлялись необходимые незаменимые аминокислоты за счет введенной смеси, в том числе с разветвленной углеродной цепью (лейцин, валин), количество которых для эффективного синтеза белков, вероятно, в крови было недостаточным. При этом не исключается непосредственное анаболическое воздействие введенных аминокислот в тканях, минуя индукцию гормонов (23, 24), а также предпочтительное использование их в энергетических реакциях (6, 12).

Ключевое значение глутамин в регуляции и поддержании синтеза белка в мышечной и других тканях было выявлено ранее (21, 23), но механизм этого явления полностью не раскрыт. Известно, что глутамин быстрее глутаминовой кислоты проникает через клеточные мембраны и служит источником ее (12). Кроме того, глутамин поставляет в клетки азот, необходимый для целого ряда биохимических реакций. Так, амидный азот глутамин используется в цитозоле клеток для образования карбамоилфосфата, служащего совместно с аспаратом основой пиридиновых колец (8, 12).

В проведенных опытах не отмечено повышения выделения инсулина в крови под действием «глутаминовой» смеси, хотя уровень глюкозы снижался. Возможно при этом не затрагивалась индукция и других гормонов «общего» действия, а анаболический (или антикатаболический) эффект проявлялся на уровне тканей, в том числе и мышечной, рост которой у животных опытной группы увеличивался. Включенные в состав смеси дикарбоновые аминокислоты, из которых глутаминовая кислота является прямым предшественником глутамин, способствовали повышению его уровня в крови и тканях, что наблюдалось в первой серии опытов.

Процентное содержание глутамин в крови телят в большинстве опытов находилось в прямой связи с уровнем глутамата и аспартата, в то время как с концентрацией глицина, аланина и гистидина корреляция была отрицательной. Известно, что последние аминокислоты ингибируют активность глутаминсинтетазы, катализирующей образование глутамин из глутамата (8, 12). Наиболее высокая активность этого фермента наблюдалось в печени, а в мышечной ткани в несколько раз ниже (8).

Заключение

Выполненные на телятах-молочниках исследования позволили выявить участие ряда заменимых и незаменимых аминокислот в регуляции межклеточного обмена и формировании мясной продукции у этих животных. Установлено, что аминокислоты оказывают свое действие как через изменение выделения отдельных гормонов, так и путем непосредственного влияния на интенсивность и направленность тканевого обмена, минуя индукцию гормонов, проявляя при этом анаболический (или антикатаболический) эффект.

На основании полученных результатов и данных литературы можно сделать заключение о целесообразности использования ряда аминокислот в качестве активных компонентов различных добавок и препаратов для стимуляции анаболических процессов и повышения мясной продуктивности молодняка крупного рогатого скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И. Секрция гормона роста в норме и патологии. М., 1978.
2. Жирков И.Н., Харитонов Л.В. Участие аминокислот в регуляции сычужной секреции у телят. Тез. докл. научн. конфер.: Физиологические основы повышения продуктивности с.-х. животных. Дивово, 1995: 76-78.
3. Изучение пищеварения у жвачных. Методическое руководство. Сост.: Курилов Н.В., Севастьянова Н.А. и др., Боровск, 1987.
4. Климов П.К. Пептиды и пищеварительная система. Л., 1983.
5. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск, 1976.
6. Коньшев В.А. Питание и регулирующие системы организма. М., 1985.
7. Кудрин А.Н., Пономарева Г.Т. Применение математики в экспериментальной и клинической медицине. М., 1967.
8. Ленинджер А. Биохимия. М., 1974.
9. Методы биохимического анализа. Боровск, 1997.
10. Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты. М., 1986.
11. Руководство по клинической лабораторной диагностике. ч.3. Клиническая биохимия. Киев, 1986.
12. Страйер Л. Биохимия. 1984, т. 2: 262.
13. Харитонов Л.В. Роль продуктов рубцовой ферментации в регуляции сычужной секреции у овец. Матер. VI Всес. конфер. по физиол. и биохим. основам повышения продуктивности с.-х. животных. Боровск, 1968: 246-247.
14. Харитонов Л.В., Харитонova О.В. Роль аминокислот в регуляции сычужного пищеварения у телят. Тез. докл. научн. конфер.: Теория и практика использования биологически активных веществ в животноводстве. Киров, 1998: 85-87.
15. Черников М.П. Протеолиз и биологическая ценность белков. М., 1975.

16. Шамберев Ю.Н. Гормоны и их индукторы в регуляции роста. Тез. докл. Межд. конф.: Биологические основы высокой продуктивности с.-х. животных. Боровск, 1990, ч.2: 105-106.
17. Шамберев Ю.Н., Иванов И.С., Гаврищук В.И. Научные и практические аспекты субстратной регуляции эндокринных желез и повышения продуктивности животных. Тез. докл. научн. конф.: Теория и практика использования биологически активных веществ в животноводстве. Киров, 1998: 89-90.
18. Шлыгин Г.К., Василевская Л.С., Игнатенко Л.Г. Влияние глутаминовой кислоты и глутатиона на секреторную функцию желудка. Бюлл. экспериментальной биологии и медицины, 1988, 10: 405-408.
19. Шубникова Е.А., Коротько Г.Ф. Секреция желез. Очерки. М., 1986.
20. Bell F.R., Me Leay L.M. The effect of duodenal infusion of milk, casein, lactose and fat on gastric emptying and acid secretion in the milk-fed calf. J. Physiol., 1978, 282: 51-57.
21. Jepson M.M., Bates P.C., Broadbent P., Pell J.M., Millward D.J. Relationship between glutamin concentration and protein synthesis in rat scelete muscle. Amir. J. Physiol., 1985, 255: 116-172.
22. Holtenius H., Bjornhag G. Alanin inhibits abomasal outflow in sheep. Proc. Soc. Nutr. Physiol., 1994, 3.
23. Newsholm E.A., Newsholm P., Cure R., Challoner M.A. Ardawi M.S.M. A rale for muscle in immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. Nutrition, 1988, 4: 261-268.
24. Pierzynowski S.G., Sjodin A. Perspectives of glutamine and its derivatives as feed additives for farm animals. J. Anim. and Feed Sci., 1998, 7:79-91.

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАКТОАМИЛОВОРИНА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ТЕЛЯТ

Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, В.Г. Косолапова, С.А. Алиев
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта,
Кировская станция, Нижегородская государственная с.-х. академия

Двухлетние производственные испытания лактоамиловорина, проведенные на 1827 телятах молочного периода выращивания в различных регионах России показали, что использование этого пробиотика в качестве лечебно-профилактического средства не оказало какого-либо отрицательного влияния на состояние здоровья телят, повышало их резистентность к желудочно-кишечным расстройствам, а при возникновении диареи уменьшало продолжительность и тяжесть течения заболевания. Сохранность телят в контроле возрастала при применении лактоамиловорина до 93-100%, повышался прирост живой массы, а затраты обменной энергии и переваримого протеина на 1 кг прироста сни-

жались на 8,4% и 4,9% соответственно. При этом окупаемость затрат возросла почти в 2 раза.

Введение

На основе антагонистического и безвредного для человека и животных штамма *Lactobacillus amylovorus* БТ-24/88 (ВКПМ-В6253) во ВНИИФБиП с.-х. животных разработан новый пробиотик лактоамиловорин (1). В опытах на подсосных и послеотъемных поросятах, а также телятах-молочниках показано, что применение лактоамиловорина в течение двух месяцев обеспечивает хорошее здоровье животных, ингибирует эшерихии, сальмонеллы, гемолитические бактерии и стимулирует микроорганизмы, использующие сложные полисахариды растительных клеточных стенок, и таким образом обеспечивает поддержание оптимального микробного баланса в пищеварительном тракте. В зависимости от схемы применения (ежедневно, через день, один раз в пять дней или недельными курсами) прирост живой массы поросят в сравнении с контролем возрастал на 53-73%, а сохранность молодняка колебалась в пределах 91-100% и они не страдали расстройствами пищеварения (2-4). Использование лактоамиловорина при выращивании телят обеспечивает профилактическое (86%) и лечебное действие при кишечных заболеваниях, повышает потребление животными комбикорма и прирост живой массы на 34,7-42,3% и 9,8-22,1% соответственно. Дача животным лактоамиловорина стимулирует реакции неспецифического иммунитета и стабильно поддерживает выраженное антихолестеринэмическое действие (5, 6).

Материалы по разработке лактоамиловорина рассмотрены Советом по ветеринарным препаратам департамента ветеринарии Минсельхозпрода РФ (протокол №4 от 21.06.96) и препарат рекомендован к применению в ветеринарии в порядке широкого производственного испытания, которое и являлось задачей наших исследований.

Материал и методы

В 1997 году было проведено 4 производственных опыта. Первый из них был организован в период массовых отелов коров на молочно-товарной ферме №2 отделения Кривское агрофирмы «Кривское» Боровского района Калужской области. Выпойку телят и уход за ними до 10-дневного возраста осуществляли доярки, а затем животных передавали в телятник, где они находились до 30-дневного возраста. Выпойка и подкормка телят проводилась по принятой в хозяйстве схеме. Опытную и контрольную группы животных формировали по мере рождения телят, в результате чего в опытной группе, получавшей лактоамиловорин, за 3,5 месяца опыта было 115 голов, а в контрольной – 50 голов.

В предыдущие годы в агрофирме «Кривское» заболеваемость органов пищеварения у телят раннего возраста составляла 96-100%, а отход достигал 12-16%. Поэтому в хозяйстве разработана и применяется определенная схема лечения диспепсий у телят. С профилактической целью всем новорожденным животным согласно наставления давали кормовой антибиотик биовит-80, а при возникновении тяжелых желудочно-кишечных расстройств им вводили гентамицин и байтрил. Затраты на ежедневный курс лекарственного лечения составляли в среднем до 20-25 тыс. руб на одного теленка (цены 1997 года). По этой схеме лечили заболевших контрольных животных.

Для профилактики диарей у телят опытной группы использовали жидкий лактоамиловорин, который задавали начиная с первой выпойки молозива в дозе 15 мл на одну голову в сутки. При появлении желу-дочно-кишечных расстройств его применяли уже с лечебной целью 2 раза в день в дозе 30 мл индивидуально каждому теленку до выздоровления. Для испытаний использовали свежеприготовленный лактоамиловорин партий 1-8 с титром колонии образующих единиц (к.о.е.) $2,6 - 4,1 \times 10^9$ мл. Препарат готовили в лаборатории биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта ВНИИФБиП с.-х. животных и еженедельно доставляли в хозяйство.

Второй производственный опыт по испытанию эффективности применения лактоамиловорина проведен на телятнике – профилактории Кировской лугоболотной опытной станции. В контрольной и опытной группах было по 30 животных, которых кормили по следующей схеме (табл.1).

Таблица 1. Схема производственной проверки

Группы животных	Состав рациона
Контрольная	Сено, концентраты, молоко, минеральные подкормки
Опытная	Сено, концентраты, молоко, минеральные подкормки + 10 мл лактоамиловорина в первые 5 дней ежедневно, а затем 1 раз в 10 дней

Первую порцию лактоамиловорина давали с первой выпойкой молозива. В опытах использовали жидкий лактоамиловорин с титром $3-5 \times 10^8$ к.о.е./мл.

Рацион телят в месячном возрасте состоял из 6 кг молока, 0,3 кг концентрированных кормов, 5 г преципитата, 5 г соли и сена вволю. В 2-месячном возрасте в состав рациона входило 4 кг молока, 0,6 кг сена, 0,9 кг концентрированных кормов, 10 г соли и 10 г преципитата. В 3-месячном возрасте рацион состоял из 1 кг сена, 1,4 кг концентрированных кормов, 3 кг молока, 15 г соли и 15 г преципитата. В течение 3-

месячной производственной проверки животных взвешивали ежемесячно.

Третий научно-хозяйственный опыт проведен в колхозе им. С.М. Кирова Богородского района Нижегородской области. Из новорожденных телят было сформировано 2 группы по 8 голов в каждой. Молодняк выращивали по схеме выпойки, принятой в хозяйстве, а животным опытной группы, начиная с первой выпойки молозива, добавляли в молоко лактоамиловорин в рекомендованной дозе 10 мл в первые 5 дней ежедневно, а затем один раз в 10 дней до 108-дневного возраста.

Четвертый научно-хозяйственный опыт выполнен аналогично третьему в АО «Линдовское» Борского района Нижегородской области. Из новорожденных телят черно-пестрой породы было подобрано 2 группы по 8 голов в каждой. Опыт продолжался 116 дней. Кормили телят по принятой в хозяйстве схеме выпойки, а животные опытной группы дополнительно к основному рациону в смеси с молоком получали лактоамиловорин в первые 5 дней ежедневно один раз в день в дозе 10 мл, а затем в этой же дозе один раз в 10 дней до окончания опыта.

Производственные испытания эффективности применения лактоамиловорина при выращивании телят в 1998 году были проведены в 5-ти хозяйствах Боровского района Калужской области в период массовых отелов коров с января по май.

В АО «Родина» производственный опыт выполнен в период с 17 февраля по 15 мая 1998 года на молочно-товарной ферме отделения «Совьяки». Выпойку телят и уход за ними до 10-дневного возраста осуществляли доярки, а затем животных переводили в телятник и наблюдали за ними до месячного возраста. Выпойка и подкормка телят проводилась по принятой в хозяйстве схеме. Опытную и контрольные группы животных формировали по мере рождения телят, в результате чего в опытной группе, получавшей лактоамиловорин, за 3 месяца опыта было 105 голов, а в контрольной – 20 голов.

Для профилактики диарей у телят опытной группы использовали жидкий лактоамиловорин, который задавали начиная с первой выпойки молозива в дозе 15 мл на одну голову в сутки в течение месяца. При появлении желудочно-кишечных расстройств его применяли уже с лечебной целью 2 раза в день в дозе 30 мл индивидуально каждому теленку до выздоровления. При испытаниях использовали свежеприготовленный лактоамиловорин с титром $2,5 - 4,0 \times 10^9$ к.о.е./мл.

В других хозяйствах (колхоз «Москва», колхоз им. Циолковского, АО «Борисово» и СКХ «Русь») производственные испытания проводились ветспециалистами хозяйств под наблюдением госветслужбы района и методическом руководстве сотрудников лаборатории.

Выпойку телят осуществляли по принятым в хозяйствах схемам. Новорожденные животные в первые три дня после рождения однократно и ежедневно получали по 15 мл жидкого лактоамиловорина (профилактическая доза). Затем дачу пробиотика прекращали, а при заболевании животных диареей препарат назначали в лечебной дозе (30 мл) 2 раза в день на фоне обычно применяемой медикаментозной терапии до выздоровления. Готовили жидкий лактоамловорин в Боровской ветеринарной лаборатории по разработанному ВНИИФБиП технологическому регламенту. Всего для проведения испытаний было приготовлено 120 л препарата.

Результаты и обсуждение

Производственная проверка эффективности применения лактоамиловорина при выращивании телят до месячного возраста, проведенная в агрофирме «Кривское», показала, что дача пробиотика не оказала какого-либо отрицательного влияния на состояние здоровья животных и существенно повышала их резистентность к желудочно-кишечным заболеваниям.

Таблица 2. Ветеринарно-зоотехнические показатели эффективности применения лактоамиловорина при выращивании телят-молочников до месячного возраста

Показатели	Группы животных	
	контрольная	опытная
1	2	3
Количество телят в группе, голов	50	115
Заболело телят:		
голов	47	56
%	94,0	48,7
в возрасте, сут	1,5 ± 0,2	3,5 ± 0,5*
Средняя продолжительность болезни, сут	4,7 ± 1,3	3,0 ± 1,0
Пало в период опыта:		
голов	3	3
%	6,0	2,6
Вынужденно убито:		
голов	5	5
%	10,0	4,35
Сохранность, %	84	93
Живая масса телят в начале опыта, кг	23,9 ± 0,2	24,0 ± 0,4
Живая масса телят в 30-дневном возрасте, кг	43,85 ± 2,2	46,2 ± 2,4
Валовой прирост, кг	19,95 ± 1,7	22,2 ± 1,8
Среднесуточный прирост живой массы:		
г	665 ± 39	740 ± 25
% к контролю	100,0	111,3

* P < 0,05. Достоверность разницы показана в сравнении с контролем.

Так, если в контрольной группе из 50 голов заболело 47 или 94%, то в опытной группе из 115 телят только у 56 появлялись клинические признаки диареи и профилактический эффект лактоамиловорина составил 51,3% (табл. 2). При этом животные контрольной группы заболели, как правило, в первые 1,5 суток после рождения, тогда как в опытной группе в среднем на четвертые сутки, а продолжительность болезни составила 4,7 и 3 сут соответственно. Опытные телята переболели значительно легче и болезнь у многих из них завершилась без дополнительного медикаментозного лечения. Сокращение сроков продолжительности болезни у получавших пробиотик телят на 1,7 сут позволило снизить расходы на лечение в ценах января 1997 года на 10-12 тыс. рублей на одно животное.

Результаты испытаний также подтвердили данные о положительном действии лактоамиловорина на эффективность использования корма. Так, среднесуточный прирост опытных телят при прочих равных условиях составил 740 г, против 665 г в контроле, или превосходил последний на 11,3%. Таким образом, производственная проверка полностью подтвердила результаты научно-хозяйственных опытов о положительном действии пробиотика на организм животных. Высокая эффективность использования лактоамиловорина получена и во втором опыте при выращивании телят-молочников до 3-месячного возраста (7). За этот период дача пробиотика увеличивала среднесуточный прирост на 9,2%. На 1 кг прироста живой массы животными контрольной группы израсходовано 35,7 МДж обменной энергии и 366 г переваримого протеина, тогда как у телят опытной группы эти показатели равнялись 32,7 МДж и 348 г соответственно (табл. 3). При этом окупаемость одной тысячи затрат возрастала почти в два раза, а экономический эффект составил 101,74 тыс. руб на одну голову.

Таблица 3. Эффективность использования лактоамиловорина при выращивании телят до 3-месячного возраста

Показатели	Группы животных	
	контрольная	опытная
1	2	3
Количество телят в группе, голов	30	30
Живая масса, кг:		
в начале опыта	36,4 ± 0,23	36,8 ± 0,57
в конце опыта	91,9 ± 0,73	97,4 ± 0,63
Прирост живой массы одной головы за опыт:		
валовой, кг	55,5 ± 0,9	60,6 ± 1,1
среднесуточный, г	616,7 ± 10	673,3 ± 11,1
% к контролю	100,0	109,2

Средняя цена реализации за 1 ц полученной продукции, руб	1142000	1142000
Прямые затраты на производство 1 ц продукции, руб	1010648	908906
в т.ч. стоимость пробиотика, руб	–	7000

продолжение таблицы 3

1	2	3
Чистый доход, руб	131352	233094
Себестоимость 1 ц продукции, руб	1161664	1044720
в т.ч. стоимость кормов на 1 ц прироста, руб	606389	561149
Затрачено на 1 кг прироста:		
обменной энергии, МДж	35,7	32,7
переваримого протеина, г	366	348
Окупаемость 1 тысячи затрат, руб	130,0	256,0
Экономическая эффективность руб	–	101742

Положительные результаты испытаний лактоамиловорина получены и в хозяйствах Нижегородской области. Так, в колхозе им. Кирова применение пробиотика предохраняло от заболеваний пищеварительного тракта 37% телят и обеспечило полную их сохранность, тогда как в контрольной группе заболели все животные, одно из которых погибло (табл. 4). В АО «Линдовское» при даче лактоамиловорина хотя и заболели все телята, но переболели они относительно легко и их сохранность составила 100%, а в контроле только 75%. При этом в колхозе им. Кирова и АО «Линдовское» при продолжительности наблюдений 108 и 116 дней прирост живой массы телят, получавших лактоамиловорин, превосходил таковой в контроле на 11,7% и 8,2% соответственно.

Таблица 4. Эффективность применения лактоамиловорина при выращивании телят в хозяйствах Нижегородской области

Показатели	Хозяйства и группы животных			
	колхоз им. Кирова		АО «Линдовское»	
	контроль	опытная	контроль	опытная
1	2	3	4	5
Продолжительность опыта, дн.	108	108	116	116
Количество телят в группе, гол.	8	8	8	8
Заболело животных:				
голов	8	5	8	8
%	100	63	100	100
Пало в период опыта:				
голов	1	0	2	0
%	12	0	25	0
Сохранность, %	88	100	75	100
Живая масса телят, кг				
в начале опыта	30,9	30,9	26,0	26,2
в конце опыта	70,4	75,1	76,7	81,1

Среднесуточный прирост живой массы:				
г	366	409	437	473
% к контролю	100	111,7	100	108,2
Экономический эффект на 1 голову, руб.		98834		

Высокая эффективность применения лактоамиловорина при выращивании телят нашла подтверждение и в испытаниях, проведенных в 1998 году.

Так, в АО «Родина» Боровского района Калужской области дача пробиотика не оказала отрицательного влияния на состояние здоровья животных и существенно повышала их резистентность к желудочно-кишечным заболеваниям. Если в контрольной группе из 20 голов заболело 15 или 75%, то в опытной группе из 105 телят только у 27 появлялись клинические признаки диареи и профилактический эффект лактоамиловорина составил 74,3% (табл. 5). При этом животные контрольной группы заболевали, как правило, на третьи сутки после рождения, тогда как в опытной группе в среднем на шестые сутки, а продолжительность болезни составила 7 и 3,6 сут соответственно. Телята опытной группы переболели значительно легче и болезнь у многих из них завершалась выздоровлением без дополнительного медикаментозного лечения. Сокращение продолжительности болезни у получавших пробиотик телят на 3,4 сут позволило снизить расходы на их лечение и значительно улучшало эффективность использования корма.

Таблица 5. Эффективность применения лактоамиловорина при выращивании телят-молочников до месячного возраста в АО «Родина»

Показатели	Группы животных	
	контрольная	опытная
Количество телят в группе, голов	20	105
Заболело телят диареей:		
голов	15	27
%	75	25,7
День начала заболевания после рождения	2,4 ± 0,3	5,5 ± 0,2 ^б
Продолжительность заболевания, сут	7,0 ± 0,5	3,6 ± 0,38 ^б
Пало в период опыта:		
голов	3	4
%	15,0	3,8
Сохранность, %	85	96
Живая масса телят при рождении, кг	25	25
Живая масса телят в 30-дневном возрасте, кг	44,6 ± 2,0	47,4 ± 2,1
Валовой прирост, кг	19,6 ± 0,6	22,4 ± 0,71 ^а
Среднесуточный прирост живой массы		
г	653 ± 30,8	746 ± 37,6
% к контролю	100	114,2

Примечание. достоверность разницы показана в сравнении с контролем (а –

P < 0,02; б – P < 0,001).

Среднесуточный прирост получавших пробиотик телят при прочих равных условиях составил 746 г, против 653 г в контроле, или превосходил последний на 14,2%.

Таблица 6. Заболеваемость телят диарейми в хозяйствах Борисовского района в январе-апреле 1997 – 1998 годов

Показатели	Годы наблюдений и наименование хозяйств							
	1997				1998			
	колхоз Москва	АО Борисово	колхоз им. Циолковского	СКХ Руть	колхоз Москва	АО Борисово	колхоз им. Циолковского	СКХ Руть
Народилось телят, голов	3	3	2	2	3	4	2	2
	8	9	7	5	5	3	9	5
в том числе:	4	2	8	5	0	8	8	5
заболело диарейми, голов	2	1	1	1	2	1	2	1
	8	7	8	6	9	4	7	6
	8	6	7	7	5	0	5	0
%	7	4	3	5	4	1	2	2
	5	,	,	,	,	,	,	,
		9	7	5	3	7	3	7
пало животных, голов	1	1	1		5	6	6	1
	8	0	3	–	5	6	6	1
%	4	2	4	–	1	1	2	0
	,	,	,	–	,	,	,	,
	7	6	7		4	4	0	4
вынуждено убито, голов								
	1	–	–	2	3	–	–	–
	0			0	0			
%	,	–	–	,	,	–	–	–
	3			8	9			
Сохранность, %	9	7	5	9	7	8	8	9
	5	,	,	,	,	,	,	,
		4	3	2	7	6	0	6

Примечание: отхода или вынужденного убоя телят не было.

Результаты испытаний лактоамиловорина в других колхозах и акционерных предприятиях, суммированные в таблице 6, свидетельствуют о том, что профилактический эффект в разных хозяйствах заметно варьировал. Так, в АО «Борисово» заболеваемость телят диарейми

снизилась с 44,9% в 1997 году до 31,7% в 1998 году, в СКХ «Русь» этот показатель составил 65,5 и 62,7% соответственно, тогда как в колхозах «Москва» и им. Циолковского заболеваемость молодняка желудочно-кишечными расстройствами возрастала. Тем не менее, в среднем по этим хозяйствам падеж животных по причине диарей снизился с 41 головы в 1997 году до 18 голов в 1998 году, или на 55,1%, а сохранность увеличилась с 96,7% до 98,5% соответственно.

Таким образом, двухлетние производственные испытания лактоамиловорина, проведенные в разных регионах России, свидетельствуют с высокой лечебно-профилактической его эффективности при расстройствах желудочно-кишечного тракта, протекающих с клиникой диареи, и позволяют рекомендовать этот пробиотик для широкого использования в ветеринарии.

Заключение

В 1997 – 1998 годах в хозяйствах Калужской, Кировской, Нижегородской областей проведены широкие производственные испытания эффективности применения лактоамиловорина при выращивании телят-молочников. Установлено, что использование пробиотика не оказало какого-либо отрицательного влияния на состояние здоровья телят, на 37-74% повышало их резистентность к желудочно-кишечным расстройствам, а при возникновении диареи уменьшало на 1,7-3,4 сут продолжительность и тяжесть заболевания. Сохранность телят с 75-88% в контроле возрастала при применении лактоамиловорина до 93-100%, на 8,2 – 14,2% повышался прирост живой массы, а затраты обменной энергии и переваримого протеина на 1 кг прироста снижались на 8,4% и 4,9% соответственно. При этом окупаемость затрат возрастала почти в два раза, на 10-12 тыс. руб уменьшались расходы на лечение одного животного, а экономический эффект при выращивании телят до 3-месячного возраста достигал 98,8-101,7 тыс. руб на одну голову.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тараканов Б.В. Штамм бактерий *Lactobacillus amylovorus*, используемый для производства пробиотика лактоамиловорина. Патент РФ N2054478, МКИ С12 № 1/20, заявл. 01.10.92., опубл. 20.02.96. Бюлл. № 5.
2. Тараканов Б.В., Клабукова Л.Н., Пузач Л.В. Способ выращивания поросят. Патент РФ № 2062038, МКИ А23 К 1/175, заявл. 29.06.93, опубл. 20.06.96. Бюлл. № 17.
3. Тараканов Б.В., Клабукова Л.Н., Пузач Л.В. Эффективность применения нового пробиотика лактоамиловорина при выращивании поросят. В кн.: Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания с.-х. животных. Отчет ВНИИФБиП за 1992-1993 гг. Боровск, 1993: 358-359.
4. Тараканов Б.В., Клабукова Л.Н., Николичева Т.А., Пузач Л.В. Микрофло-

- ра пищеварительного тракта, неспецифическая резистентность и продуктивность поросят при применении лактоамиловорина. Ветеринария, 1999, 8: 51-54.
5. Тараканов Б.В., Харитонов Л.В., Клабукова Л.Н. Состав микрофлоры, рубцовое и сычужное пищеварение и реакции неспецифического иммунитета телят под влиянием пробиотика лактоамиловорина. Сельскохозяйственная биология, 1998, 4: 97-103.
 6. Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Клабукова Л.Н. Изучение эффективности лактоамиловорина при выращивании телят. Ветеринария, 1999, 7: 44-47.
 7. Тараканов Б.В., Косолапова В.Г. Применение лактоамиловорина при выращивании телят. Зоотехния, 1999, 9: 10-13.

СУБМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ КРОЛИКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В РАЦИОНЕ РАЗНЫХ ДОЗ ЛАКТОАМИЛОВОРИНА

А.И. Манухина, Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева

Кабинет морфологических исследований.

Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта

В опытах на растущих и взрослых кроликах изучали влияние длительного скармливания рекомендуемой ($1,2 \times 10^9$ микробных тел), 10-и и 100-кратно повышенных доз пробиотика лактоамиловорина на ультраструктуру органов иммунной системы. Установлено, что применение пробиотика в рекомендуемой и 10-и кратной дозах оказало стимулирующее действие на лимфоидную ткань. Во всех структурах изучаемых органов отмечена тенденция к увеличению числа зрелых и незрелых плазматических клеток и усиление лимфопоэза, что свидетельствует о положительном влиянии препарата на иммунную систему кроликов и, вследствие этого, на повышение адаптации к неблагоприятным условиям среды. Длительное применение 100-кратной дозы препарата сопровождалось снижением доли паренхимы, увеличением стромальных элементов и угнетением лейкопоэза.

Введение

Пробиотики это живые микроорганизмы, которые вводятся в корма животных для стимуляции их роста и устойчивости к стрессу (11). Нормально функционирующая резидентная микрофлора кишечника контролирует в нем продукцию токсинов, предупреждая их избыточную выработку и попадание в кровоток. В результате метаболизма

пробиотиков, обладающих детоксирующими и протеолитическими свойствами, в кишечнике в основном обеспечивается протеолиз эндотоксинов, аллергенов и антигенов (10). Этими свойствами обладают молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, при применении которых наблюдается стимуляция иммунного ответа и повышение неспецифической иммунорезистентности – потенцирование продуктов интерферона, интерлейкинов, увеличение фагоцитарной способности макрофагов и др. (12). Эта функция пробиотиков в настоящее время вызывает все возрастающий интерес и активно изучается, в частности, проводится поиск штаммов с наиболее выраженными иммуногенными свойствами (3). Недавно в литературе было высказано мнение о пробиотиках как о пероральных вакцинах, альтернативных подобным препаратам из специфических микроорганизмов. Молочнокислые бактерии рассматриваются как живые носители иммуногенов и защитных антигенов, а разработка эффективных препаратов из пробиотиков признается одним из самых приоритетных направлений современной вакцинологии (1, 8). Роль лактобацилл как пробиотиков, наиболее активно участвующих в морфогенезе и функционировании иммунокомпетентных клеток и тканей организма хозяина, мало изучена.

Для широкого внедрения препаратов на основе лактобацилл крайне необходимо решение вопроса о соотношении негативных последствий и положительных эффектов применения разных доз на организм животных (5).

Учитывая все вышеизложенное мы провели исследование ультраструктуры органов иммунной системы кроликов, получающих в рационе разные дозы препарата на основе лактобацилл (лактоамиловорина), в течение 13 месяцев.

Материалы и методы

Опыты проведены в виварии института на кроликах калифорнийской породы. Из крольчат 2-месячного возраста было сформировано 4 группы по 12 голов в каждой. Животные контрольной (1-й группы) получали сбалансированный основной рацион (ОР) по существующим нормам кормления. Кролики 2-й группы получали ОР и рекомендуемую дозу ($1,2 \times 10^9$ микробных тел) лактоамиловорина на голову в сутки один раз в неделю, 3-ей группы 10-ти кратную и 4-й 100-кратную дозу препарата в течение 13 месяцев. После убоя животных, по 3 головы из группы, у них были взяты для морфологического исследования тимус, селезенка, брыжеечный лимфоузел, 12-перстная, подвздошная и слепая кишки. Для электронной микроскопии кусочки органов фиксировали в 3%-ном растворе глютарала с последующей фиксацией в 1%-ном растворе четырехоксида осмия. После обезвоживания

заливали смесью эпона и аралдита, изготавливали срезы на ультратоме, контрастировали цитратом свинца и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе ЭМ-100К.

Результаты и обсуждение

В тимусе кроликов 2-й и 3-й групп, наряду с большим количеством лимфобластов в корковом и мозговом веществе, увеличилось число зрелых лимфоцитов (средних и малых). Одни лимфоциты были со светлой электронно-прозрачной цитоплазмой, в которой слабо развиты митохондрии и рибосомы, другие – с темной цитоплазмой, содержащей больше органелл, особенно рибосом (рис. 1). По мнению Д.Я. Фриденштейна и Е.Д. Лурия (9), светлые клетки являются молодыми, а темные более дифференцированными клетками лимфоидной линии.

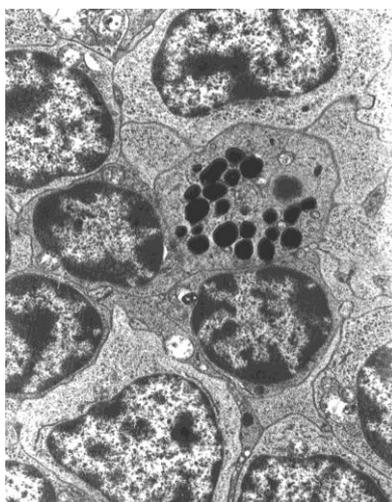


Рис. 1 Светлые и темные лимфоциты в корковом веществе тимуса кроликов 2-й группы. Электронограмма (здесь и далее). Ув. 10000.

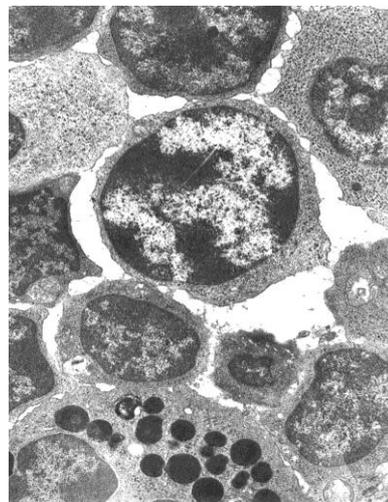


Рис. 2 Контакты лимфоцитов со стромальными клетками тимуса кролика 3-й группы. Ув. 14000.

В цитоплазме стромальных (интердигитирующих и эпителиальных) клеток увеличивалось количество рибосом и митохондрий, появились фагосомы. Можно отметить наличие выростов, осуществляющих контакты между стромальными клетками и лимфоцитами (рис. 2). Все это говорит о возросшей функциональной активности стромальных клеток. Имеются литературные данные (6, 7) о том, что эпителиальные клетки тимуса играют важную роль в процессе презента-

ции антигенов пре-Т-лимфоцитам и участвуют в выработке цитокинов, таких как интерлейкин, тимозин и др. У подопытных кроликов в тимусе увеличивалась плотность расположения лимфоцитов около сосудов, а также вокруг стромальных клеток. В этот комплекс входили и лимфобласты (рис. 3). В цитоплазме эпителиальных клеток стромы органа увеличилось количество плотных телец и светлых вакуолей. Эти вакуоли часто контактировали с поверхностной мембраной клетки и даже непосредственно с рядом лежащими лимфоцитами.

В тимусе кроликов 4-ой группы было отмечено снижение пролиферативной активности, опустошение лимфоидной паренхимы, увеличение числа стромальных клеток, расширение сосудов, отеки, стазы (рис. 4). Увеличилось число дегенерирующих клеток в корковом и мозговом веществе.

У кроликов 2-й и 3-й групп возрастал размер *лимфатических узлов*, увеличивалась доля коркового вещества, площадь вторичных лимфоидных узелков, герминативных центров, расширилась синусная сис-

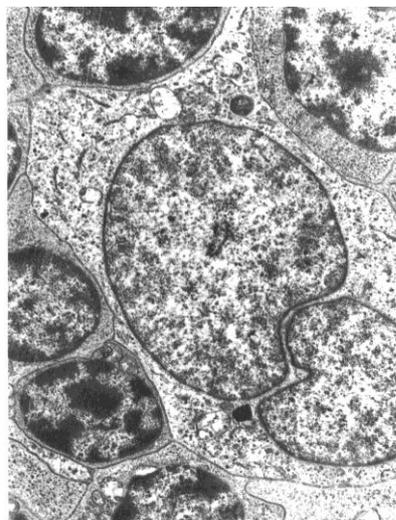


Рис. 3 Лимфобласты плотно прилегают к эпителиоретикулярной клетке тимуса. Ув. 15000.

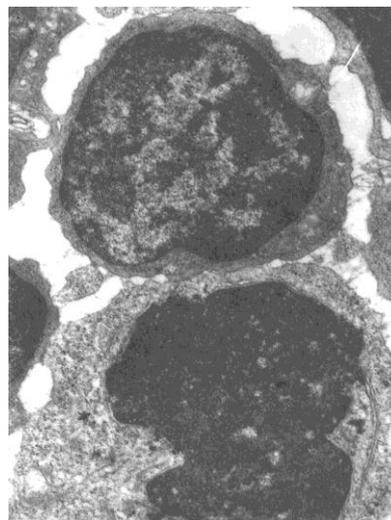


Рис. 4 Деструкция лимфоцитов и отеки в паренхиме тимуса кроликов 4-й группы. Ув. 18000.

тема органа по сравнению с контрольными животными. Наблюдалось увеличение количества бластов, незрелых клеточных форм во всех зонах лимфатического узла, повышение митотической активности клеток в герминативных центрах (рис. 5), возросло число макрофагов, незрелых и зрелых плазматических клеток, что дает основание утверждать о значительной биологической (антигенной) стимуляции лимфоидной

ткани подопытных кроликов, получивших рекомендуемую ($1,2 \times 10^9$ микробных тел) и 10-кратную дозу лактоамиловорина.

При длительном использовании 100-кратной дозы препарата снижалось содержание доли зрелых лимфоцитов. Ультраструктурные изменения клеток имели скорее деструктивный, чем функциональный характер. Встречались клетки с пикнотическими ядрами, глыбчатой, вакуолизированной цитоплазмой (рис. 6).

Обнаружены герминативные центры, в клеточном составе которых доминировали ретикулярные клетки и малые лимфоциты, митотическая активность была подавлена. Границы некоторых лимфоидных узлов сглажены, а в отдельных случаях в периферической зоне узелка, обращенной к мозговому веществу, происходило исчезновение лимфоцитов и герминативный центр лимфоидного узелка оставался обнаженным (рис. 7).

В лимфоидных структурах *селезенки* кроликов 2-й и 3-й групп обнаружены морфологические проявления антигензависимой пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток. Лимфоидные узелки

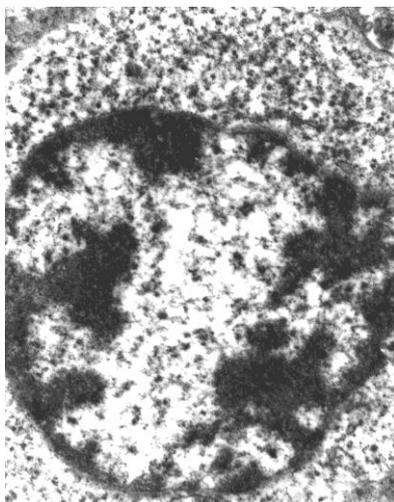


Рис. 5 Лимфобласт в герминативном центре лимфатического узла кролика 2-й группы. В обширной цитоплазме содержится большое количество рибосом и полисом. Ув. 25000.

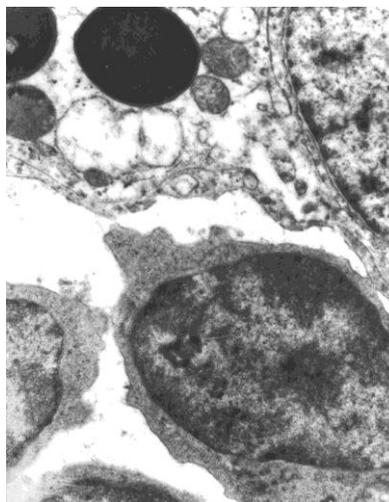


Рис. 6 Вакуолизация цитоплазмы и пикноз ядер лимфоцитов в мякотных шнурах лимфатического узла кролика 4-й группы. Ув. 14000.

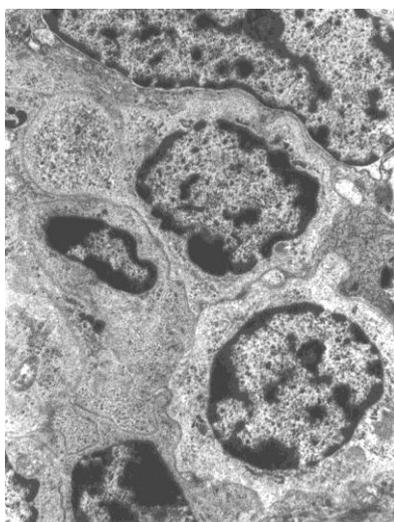


Рис. 7 Опустошение герминативного центра лимфоидного узелка в лимфоидных узлах кролика 4-й группы. Разрастание стромальных клеток узелка. Ув. 14000.

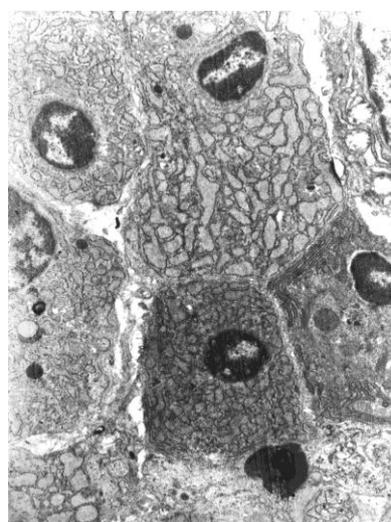


Рис. 8 Скопление зрелых плазматических клеток в красной пульке селезенки кролика 3-й группы. Ув. 14000.

без герминативных центров в селезенке встречались значительно реже, чем у животных контрольной группы. В герминативных центрах лимфоидных узелков селезенки значительно возросло количество бластов и больших лимфоцитов, а также митотически делящихся клеток. В клеточных скоплениях красной пульпы селезенки отмечено увеличение количества зрелых плазматических клеток (рис. 8).

У кроликов 4-й группы в селезенке отмечены морфологические признаки угнетения пролиферации лимфоидных клеток. Увеличивалось количество узелков без герминативных центров. В последних количество бластов и больших лимфоцитов снижалось ниже контрольного уровня. Митотически делящихся клеток не обнаружено. Содержание плазматических клеток в лимфоидных скоплениях красной пульпы уменьшалось. Встречались участки опустошения и деструкции органа.

В *лимфатических узелках* на всем протяжении кишечника кроликов, получавших рекомендуемую и 10-кратную дозы препарата наблюдалось увеличение числа лимфоцитов в эпителиальном пласте, особенно в области купола. Их содержалось 30% против 14% в контроле. Лимфатические фолликулы были гипертрофированы и содержали четко выраженные реактивные центры, в которых располагались крупные лимфобласты и пролимфоциты, имеющие базофильную цитоплазму. Часто встречались плазматические клетки различной степени зрелости, некоторые из них контактировали с макрофагами и с лимфоцитами, формируя своеобразные островки (рис. 9). Плазматические клетки содержали многочисленные органеллы, в некоторых клетках отмечалось набухание митохондрий и появление в их матриксе миелиновых структур, вакуолизация гранулярной эндоплазматической сети. В межфолликулярных участках выявлялись отросчатые ретикулярные клетки, между отростками которых располагались малые и средние лимфоциты с темной цитоплазмой, содержащей многочисленные свободные рибосомы (рис. 10).

Установлено (2, 4, 5), что большинство лимфоидных клеток слизистых оболочек обладают высокой митотической активностью. Они стимулируются антигенами, проникающими через слизистую оболочку. Активированные антигеном лимфоциты мигрируют в кровяное русло, где пролиферируют и трансформируются в плазмобласты. Последнее в процессе миграции улавливаются преимущественно исходными тканями, поэтому иммунный ответ локализуется в области проникновения антигена. На этом факте основаны разработки методов эффективной иммунизации против кишечных инфекций (2, 12).

Изложенное свидетельствует, что у кроликов 2-й и 3-й групп в кишечнике усиливалась миграция лимфоцитов в эпителиальный пласт, что, вероятно, связано с антигенраспознающей функцией лимфоцитов.

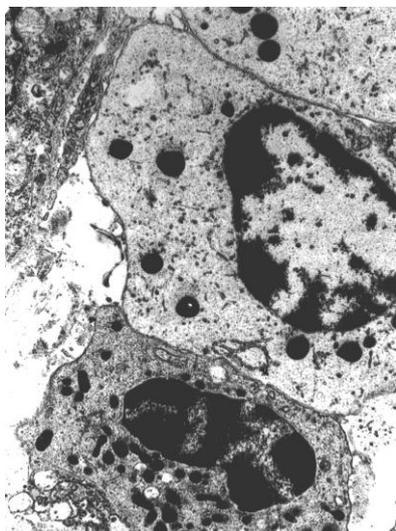


Рис. 9 Островок клеток в лимфатическом узелке кишечника кролика 2-й группы, состоящий из макрофага, лимфоцитов и плазматической клетки. Ув. 14000.

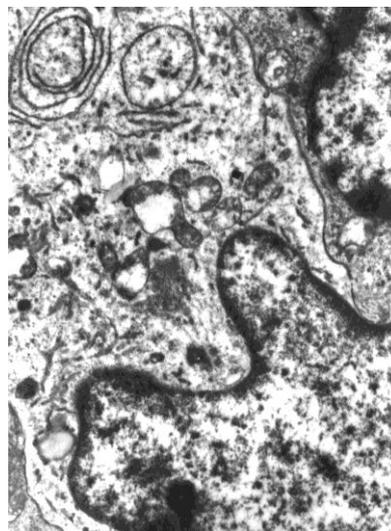


Рис. 10 Ретикулярная клетка лимфоидного узелка кишечника кролика 3-й группы, в цитоплазме расположены многочисленные органеллы. Ув. 20000.

Заметно увеличились В-зависимые зоны лимфоидных узелков, одновременно наблюдалась значительная напряженность ультраструктур плазматических клеток, повышалась межклеточная кооперация между лимфоцитами, макрофагами и плазматическими клетками. У кроликов 4-й группы лимфатические фолликулы по всей длине кишечника были дезинтегрированы, не имели выраженных границ и часто сливались с окружающей тканью. Плазматические клетки встречались редко, в цитоплазме большинства из них наблюдалась вакуолизация гранулярной эндоплазматической сети и комплекса Гольджи. Межклеточные кооперации макрофагов, лимфоцитов и плазматических клеток выявлялись крайне редко.

Заключение

Таким образом, иммуноморфологические изменения, обусловленные применением лактоамиловорина в рекомендуемой ($1,2 \times 10^9$ микробных тел) и 10-кратной дозах характеризовались выраженностью лимфоидно-гиперпластической, макрофагальной и плазмо-клеточной реакцией в органах иммунной системы. Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии лактоамиловорина на функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Однако, длительное

использование 100-кратной дозы препарата привело к прогрессирующей гипоплазии лимфоидной ткани, усилению деструкции тимоцитов. Это сочеталось со снижением площадей и индексом пролиферации Т-зависимых зон селезенки и лимфатических узлов. Указанные изменения свидетельствуют об угнетении иммунной функции изучаемых органов у животных этой группы по сравнению с контрольной. Полученные данные позволяют рекомендовать лактоамиловорин в дозе $1,2 \times 10^9$ микробных тел для использования в качестве иммуностимулятора с целью повышения неспецифической резистентности животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Петровская В.Г. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры. Вестник АМН, 1997, 3: 7-10.
2. Зуфаров К.А. Структурно-функциональные основы взаимодействия микробов со слизистой оболочкой кишечника. Клеточные механизмы приспособительных процессов. Ташкент, 1983: 3-7.
3. Коршунов В.М. Проблема регуляции микрофлоры кишечника. Микробиология, 1983, 3: 48-55.
4. Куваева И.В. Обмен веществ организма и кишечная микрофлора. М.: Медицина, 1976.
5. Лопатина Т.К., Бляхер М.С., Николаенко В.Н. и др. Иммуномодулирующее действие препаратов эубиотиков. Вестник АМН, 1997, 3: 30-34.
6. Новиков В.Д., Труфакин В.А. Органы тимолимфатической системы. Новосибир. гос. мед. ин-т, 1980: 29.
7. Петров Р.В. Иммунология и иммуногенетика. М.: Медицина, 1976: 336.
8. Сорокулова И.Б., Белявская В.А., Масычева В.А., Смирнов В.В. Рекомбинантные пробиотики: проблемы и перспективы использования в медицине и ветеринарии. Вестник АМН, 1997, 3: 46-49.
9. Фриденштейн А.Ф., Лурия В.А. Клеточные основы кроветворного микроокружения. М.: Москва, 1980: 216.
10. Majamaa H., Jsolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. I. Allerg. Clin. Immunol., 1997, 99: 79-85.
11. Probiotic: A critical review - Chapter Abstracts. Ed. Tannock J.W. Horion Scientific Press, 1998.
12. Probiotic additives. Belgian CCM News 1996, 2.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ШТАММА
LACTOBACILLUS CASEI SUBSP. PSEUDOPANTARUM LBR 33/90
ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ТЕЛЯТ**

Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева

Лаборатория биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта
Установлено, что Lactobacillus casei subsp. pseudopantarium LBR 33/90 обладает лечебно-профилактическим действием при желудочно-кишечных заболеваниях телят, благоприятно влияет на организм молодняка и повышает его сохранность с 87-90,7% до 93-96,3%. Штамм обеспечивает поддержание нормального микробного баланса в пищеварительном тракте телят, высокую эффективность использования питательных веществ корма, улучшение здоровья животных и повышение продуктивности на 17,5%.

Введение

В последние годы в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы все более широкое распространение находят микробные препараты или пробиотики, которые содержат живые микроорганизмы – симбионты желудочно-кишечного тракта. Наиболее эффективными в качестве таких препаратов могут быть молочнокислые бактерии, которые, обладая целым рядом ценных свойств, являются кроме того преобладающими в нормальной микрофлоре пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных и птиц. Действие пробиотиков основано на выработке вводимыми в организм микроорганизмами различных биологически активных веществ, угнетающих рост патогенных бактерий и активизирующих иммунологические реакции животного, а также способствующих лучшему усвоению питательных веществ кормов.

Зарубежные и отечественные исследования свидетельствуют, что применение пробиотиков в животноводстве позволяет ускорить рост молодняка и уменьшить его отход (1-4). Многие препараты служат лечебно-профилактическими средствами в борьбе с бактериальными заболеваниями молодняка, они используются при дисбактериозах, для профилактики и лечения расстройств пищеварения алиментарной этиологии. По эффективности действия пробиотики не уступают некоторым антибиотикам и химиотерапевтическим средствам, но не оказывают побочного действия на микрофлору пищеварительного тракта, не загрязняют продукцию животноводства и окружающую среду, т.е. являются экологически чистыми.

В лаборатории биотехнологии микроорганизмов пищеварительного тракта были выделены лактобациллы, обладающие высокой антагонистической активностью по отношению к патогенным видам ки-

шечной палочки, сальмонеллам, стафилококкам, стрептококкам, псевдомонадам и другим бактериям и изучены их основные физиолого-биохимические свойства. Как наиболее перспективный для применения с профилактической и лечебной целью при выращивании телят был выбран штамм *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* LBR 33/90.

Целью исследований было выяснение лечебно-профилактического действия препарата при заболевании молодняка диспепсией, а также изучение ростостимулирующего влияния пробиотика на телят в течение первого месяца жизни.

Материалы и методы

Проведено три опыта на телятах от рождения до месячного возраста в ОПХ «Ермолино», колхозах «Москва» и имени Циолковского Боровского района Калужской области,

Первый опыт выполнен в период с января по июнь на центральной ферме ОПХ «Ермолино» в период массовых отелов. На ферме имеется родильное отделение и профилакторий для новорожденных телят. В трехдневном возрасте телят переводили в индивидуальные домики на улицу. Кормили телят согласно схемы выпойки, принятой в хозяйстве.

Заболеваемость органов пищеварительного тракта у телят раннего возраста на этой ферме в предшествующие годы достигала 96-100%, а отход телят-молочников составлял 8,7-9,0%.

Для профилактики заболеваний диспепсией пробиотик выпаивали новорожденным телятам с первой порцией молозива в дозе 50 мл 1 раз в сутки в течение 3-5 дней. При возникновении заболевания дозу препарата увеличивали до 100-150 мл и задавали 2-3 раза в сутки до выздоровления животного.

Препарат готовили в лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП с.-х. животных, стерильно фасовали в стеклянные бутылки емкостью 0,5 и 0,75 л и один раз в неделю доставляли на ферму. В 1 мл препарата содержалось от 1,6 до 2,0 млрд. микробных клеток. Используемый для приготовления пробиотика штамм *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* LBR 33/90 устойчив к хлорамфениколу, тетрациклину, канамицину, цефазолину, полимиксину и может применяться совместно с этими антибиотиками при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта у телят.

При изучении эффективности применения препарата учитывали: прирост живой массы у телят в течение первого месяца жизни, сохранность телят с учетом вынужденного убоя, день возникновения заболевания после рождения и его продолжительность, затраты лекарственных средств на лечение больных животных.

Клинические наблюдения за телятами вели ветспециалисты хозяйства, проводили ежемесячное взвешивание молодняка, следили за общим состоянием животных и поедаемостью кормов.

Опытную и контрольную группы формировали по мере рождения телят, в результате чего в опытной группе, получавшей препарат с профилактической и лечебной целью, за пять месяцев опыта было 108 телят, а в контрольной – 54.

Контроль за становлением и состоянием микрофлоры пищеварительного тракта у телят осуществляли путем микробиологических исследований фекалий в месячном возрасте. При этом определяли: количество сальмонелл на среде Плоскирева; численность кишечной палочки на среде Эндо (5); микроорганизмы, обладающие гемолитическими свойствами, на кровяном агаре (6); бифидобактерии на среде Гончаровой (7), число крахмалгидролизующих на среде Хамлина (8); а лактоба-цилл, утилизирующих различные углеводы, на соответствующих модификациях среды Rogozы. Адгезию у пробиотического штамма и патогенного штамма эшерихии оценивали по методике Брилис с соавт. (9).

В колхозе «Москва» в опыт были взяты новорожденные телята от коров холмогорской породы с продуктивностью 3000 – 3200 кг за предыдущую лактацию. Родильное отделение на ферме отсутствует, растел проводится непосредственно в коровнике, а клетки для новорожденных телят располагаются около коров в кормовом проходе. Кормление телят и уход за ними осуществляли доярки, одновременно обслуживающие группу коров. Своевременность выпойки молозива новорожденным телятам нередко нарушается. Заболеваемость пищеварительного тракта у телят раннего возраста в предшествующие годы составляла 96-98%, а отход достигал 10%.

Препарат из лактобациллы применяли по схеме, приведенной выше для ОПХ «Ермолино». Всего в опыте было использовано 112 телят, при этом животные, получавшие пробиотик, по клиническому состоянию, возникновению болезни, ее продолжительности и течению сравнивались с животными, которым этот препарат не давали.

В колхозе им. Циолковского опыты по испытанию нового пробиотика проводили на фермах «Коростелево» и «Ищеино». Родильных отделений на фермах нет и отелы проводились непосредственно в скотном дворе, а затем телята поступали в приспособленный профилакторий. Кормление и уход за телятами осуществляли доярки, обслуживающие группу коров. В опытной группе было 106 телят, а в контрольной – 44. Для профилактики заболевания диспепсией препарат выпаивали новорожденным телятам с первой порцией молозива в дозе 50 мл 1 раз в сутки в течение трех дней. При возникновении заболевания пробиотик назначали в дозах 100-150 мл/гол. 2-3 раза в сутки до

выздоровления животного. Учитывали число заболевших животных, день начала заболевания после рождения теленка, продолжительность болезни и сохранность.

В месячном возрасте от животных опытной и контрольной групп фермы «Коростелево» были взяты пробы крови, в которой определяли следующие показатели: количество эритроцитов, лейкоцитов и лейкоцитарную формулу, фагоцитоз по Кост и Стенко, СОЭ по методу Панченкова, гематокрит с помощью микроцентрифуги, гемоглобин в гемометре Сали (10).

Следует отметить, что во всех трех хозяйствах, в которых изучали эффективность применения нового пробиотика, ранее регистрировались инфекционные заболевания молодняка – парагрипп, паратиф, пастереллез, а на ферме «Коростелево» из органов павших телят были выделены возбудители колибактериоза, в связи с чем глубоко стельных коров и телят-молочников вакцинировали против этих заболеваний.

Заболеваемость пищеварительного тракта у телят раннего возраста в колхозе им. Циолковского составляла 96-100%, а падеж – 10-13%.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных на телятах раннего возраста опытов установлено, что препарат из *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* LBR 33/90 оказывает лечебно-профилактическое действие при желудочно-кишечных заболеваниях.

Так, в ОПХ «Ермолино» выпаивание пробиотика новорожденным телятам сокращало заболеваемость животных и продолжительность болезни. У телят, не получавших препарат, признаки диареи появлялись уже на вторые сутки, а болезнь, несмотря на предпринимаемое интенсивное лечение, длилась 5-7 сут. Причем у 45% животных она возникала повторно в возрасте 3 недель. В опытной группе заболевание, как правило, начиналось на 3-4 сут после рождения и заканчивалось через 5 сут. Отход телят-молочников за пять месяцев опыта составил 7 голов, четыре головы пало из контрольной группы и три из опытной. Вынуждено убито было по одному теленку из каждой группы, а сохранность животных в контрольной и опытной группах составила 90,7 и 96,3% соответственно.

В колхозе «Москва» скармливание препарата из молочнокислых бактерий предупреждало возникновение диспепсии у 57% новорожденных телят, сокращало длительность заболевания на 3-4 сут и повышало сохранность молодняка на 5-7%.

Использование пробиотика в колхозе им. Циолковского с профилактической целью уменьшало заболеваемость телят с 95% в контроле до 51% в опытных группах. При лечении препаратом животные переболели значительно легче и болезнь у некоторых из них прекращалась без медикаментозного лечения. При этом средняя продолжительность болезни сокращалась на 1,3 сут, а сохранность телят повышалась с 87 до 93% (табл. 1).

Таблица 1. Заболеваемость телят диареей в колхозе им. Циолковского

Показатель	Место проведения опыта и группа животных					
	ферма «Коростелево»		ферма «Ищеино»		в среднем по колхозу	
	1	2	1	2	1	2
Количество животных в группе	28	62	16	44	44	106
Заболело диареей:						
голов	28	33	14	21	42	54
%	100	52	87	48	95	51
в возрасте, сут	1,6	3,2	3,0	4,8	2,3	4,0
Средняя продолжительность болезни, сут	3,8	2,6	3,5	2,0	3,6	2,3
Пало в период наблюдения:						
голов	4	5	2	2	6	7
%	14	8	12	4,5	13	7
Сохранность, %	86	92	88	95,5	87	93

Примечание: 1 – контрольная группа; 2 – опытная.

Исследования крови, взятой от месячных телят, не выявили каких-либо изменений в основных ее показателях. Лейкоцитарная формула у контрольных и опытных животных соответствовала лейкограмме здоровых животных. У молодняка опытной группы в крови возрастало содержание гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, а также фагоцитарная активность, т.е. применение препарата стимулировало неспецифическую резистентность организма телят (табл. 2).

Известно, что микрофлора желудочно-кишечного тракта играет важную роль в общем метаболизме организма животного. Вместе с полезной и нейтральной микрофлорой в пищеварительном канале могут уживаться потенциально патогенные бактерии. При нарушении равновесия защитные функции организма животного ослабляются, возникают диспепсии и другие заболевания. При этом увеличивается число бактерий, которые в норме отсутствуют или встречаются в незначительных количествах, утрачивается или, наоборот, усиливается ферментативная активность отдельных видов, что может приводить к серьезным осложнениям. Применение пробиотиков при выращивании мо-

лодняка позволяет нормализовать микробный баланс их кишечника, уменьшить его отход и ускорить рост.

Таблица 2. Гематологические показатели у телят месячного возраста

Показатель	Группы животных	
	контрольная	опытная
Гемоглобин, г%	10,2 ± 0,1	11,6 ± 0,25 ^а
Гематокрит, %	38,0 ± 0,3	42,0 ± 0,2 ^а
Эритроциты, млн/мм ³	7,2 ± 0,08	8,52 ± 0,11 ^б
Лейкоциты, тыс/мм ³	5,6 ± 0,12	6,49 ± 0,09 ^б
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	0,5 ± 0,00	0,6 ± 0,0
Лейкоцитарная формула, %:		
Базофилы	–	–
Эозинофилы	4,0	4,2
Нейтрофилы:		
юные	–	–
палочкоядерные	3,3	3,0
сегментоядерные	32,0	27,3
Лимфоциты	54,7	58,8
Моноциты	6,0	6,7
Фагоцитарный индекс	3,5	4,3

Примечание: а – P < 0,05, б – P < 0,01.

Исследования микрофлоры фекалий телят показали, что скармливание нового пробиотика оказало заметное влияние на микробный пейзаж пищеварительного тракта. При этом достоверно снижалось количество эшерихий, сальмонелл, а также бактерий, обладающих гемолитическими свойствами. В то же время у телят опытной группы возросла численность полезной микрофлоры – бифидобактерий, крахмал-гидролизующих микроорганизмов, а также лактобацилл, утилизирующих глюкозу, пентозы и крахмал (табл. 3). Бифидобактерии и лактобациллы являются преобладающими в пищеварительном тракте телят этого возраста. Они синтезируют витамины группы В, обладают антагонистическими свойствами, улучшают перистальтику, способствуют всасыванию кальция, витамина Д и железа (10). Увеличение численности этих микроорганизмов в пищеварительном тракте способствует устранению кишечных дисфункций и предупреждению гастроэнтеритов, что и наблюдалось в наших опытах. Этот эффект объясняется, по-видимому, тем, что адгезивность входящего в препарат штамма *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* LBR 33/90 – в 2 раза превосходила таковую патогенного и токсигенного для белых мышей штамма *E. coli* № 1111 (0149:K91:K88) и, следовательно, обеспечивала высокую

конкурентность лактобациллы с потенциальными патогенами за места обитания в кишечнике.

Таблица 3. Количество микроорганизмов разных групп в кале телят, млн/г

Группа микроорганизмов	Группы животных	
	контрольная	опытная
Сальмонеллы	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,00
Эшерихии	4,6 ± 1,1	1,5 ± 0,1 ^a
Гемолитические бактерии	12,3 ± 1,2	7,9 ± 0,7 ^a
Крахмалгидролизующие	7,2 ± 0,3	13,0 ± 1,1 ^a
Бифидобактерии	448 ± 10,2	629 ± 40,1 ^b
Лактобациллы, утилизирующие:		
глюкозу	4080 ± 700	5270 ± 400
пентозы	2950 ± 640	4880 ± 800
крахмал	530 ± 90,0	633 ± 80,0
Адгезивность:		
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplarum</i>	4,6	4,1
<i>E. coli</i> № 1111	2,5	2,1

Примечание: а – P < 0,05; б – P < 0,01.

Отмеченные в микрофлоре пищеварительного тракта изменения оказали положительное влияние на эффективность использования корма. Телята, получавшие препарат, имели хороший аппетит и ежедневно поедали на 40-60 г больше комбикорма, чем животные контрольной группы, а повышение численности крахмалгидролизующих бактерий способствовало лучшему его использованию. При этом среднесуточный прирост массы тела с 715 г в контроле увеличивался до 840 г, или на 17,5% у молодняка опытной группы, т.е. препарат обладал высоким ростостимулирующим действием, превосходящим таковое многих пробиотиков, рекомендованных для применения в ветеринарии.

Заключение

Изучение пробиотических возможностей антагонистического штамма *Lactobacillus casei subsp. pseudoplarum* LBR 33/90 показало, что он обладает лечебно-профилактическим действием при желудочно-кишечных заболеваниях телят. Его применение предохраняет от диареи 51-57% новорожденных животных, а при ее возникновении ослабляет тяжесть течения болезни и на 2-3 сут сокращает ее продолжительность, благоприятно влияет на организм молодняка и повышает его сохранность на 5-6% (с 87-90,7 до 93-96,3%). Штамм обладает высокой адгезивностью, что повышает его конкурентоспособность за места обитания, ингибирует потенциально патогенные бактерии (эшерихии, сальмо-

неллы, гемолитические бактерии), стимулирует бифидобактерии, крахмалгидролизующие организмы и лактобациллы, т.е. обеспечивает поддержание нормального микробного баланса в пищеварительном тракте телят, высокую эффективность использования питательных веществ корма, улучшение здоровья животных и увеличение на 17,5% среднесуточного прироста массы тела. Полученные данные позволяют констатировать, что штамм *Lactobacillus casei subsp. pseudoplanarum* LBR 33/90 обладает всеми основными свойствами, необходимыми для высокоэффективного пробиотика, и дальнейшее его изучение представляется перспективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антипов В.А., Ермакова Т.И. Эффективность применения пропиацита. Науч. труды ВНИИ незаразных болезней животных, Воронеж, 1990: 3-6.
2. Коняев М.Т., Косинов Л.И. Нативный бифидобактерин для профилактики и лечения острых желудочно-кишечных болезней телят и повышения привесов. В кн.: Повышение продуктивности с.-х. животных и профилактика их заболеваний в промышленных комплексах. Воронеж, 1980, 6, ч. 3: 59-60.
3. Тараканов Б.В. Использование микробных препаратов и продуктов микробиологического синтеза в животноводстве. М.: ВНИИТЭИ Агропром, 1987.
4. Микроорганизмы – стимуляторы и ингибиторы роста растений и животных. Материалы Всесоюзной конференции. Ташкент, 1989.
5. Кузьмин В.В. и др. Практические занятия по ветеринарной микробиологии. М., 1969.
6. Козлов Ю.А. Питательные среды в медицинской микробиологии. М., 1960.
7. Сорокин В.В., Тимошко М.А., Николаева А.В. Нормальная микрофлора кишечника животных. Кишнев.: Штиинца, 1972: 16-47.
8. Новые методы и модификации биохимических и физиологических исследований в животноводстве. Методическое руководство. Боровск, 1972: 85.
9. Брилис В.И., Ленцнер Х.П. и др. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. Лабораторное дело, 1986, 4: 210.
10. Сизова А.В. Значение микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных и использование бактерий-симбионтов в животноводстве. ВНИИТЭИСХ, 1974: 5-39.

ВЛИЯНИЕ *STR. BOVIS* НА БИОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА ТЕЛЯТ

И. А. Долгов, С.И. Долгова
Лаборатория пищеварения

Изучена возможность использования Str. bovis с высокой витамин В₁₂-биосинтетической и протеолитической активностью при выращивании телят. Показано, что дача телятам с профилактической целью препарата в дозе 50 мл через 40-60 минут после рождения и далее в каждое кормление в течение трех дней подряд, обеспечивает направленное формирование в пищеварительном тракте нормального микробиоценоза, снижает заболеваемость животных диспепсией на 47% и сокращает продолжительность болезни на 2-3 дня.

Введение

В настоящее время все больше внимания уделяется пробиотикам из микробных культур, которые характеризуются избирательным ингибирующим действием на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, в том числе на возбудителей острых желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных. Пробиотики регулируют микробиологические процессы в желудочно-кишечном тракте, повышают резистентность к возбудителям инфекции, стимулируют рост и тем самым снижают затраты корма на единицу прироста живой массы. Наиболее широко используются пробиотики, полученные на основе молочнокислых бактерий. Так, например, разработан препарат на основе селекционированных культур молочнокислых бактерий, принадлежащих к *Lactobacillus* и *Streptococcus* (4). Составленная композиция, как отмечают авторы, взаимно усиливает антагонистический эффект на патогенную микрофлору. Высокая адгезивность этих бактерий к энтероцитам кишечника крупного рогатого скота и устойчивость их к антибиотикам способствуют колонизации слизистой кишечника полезной микрофлорой. Отмечено положительное влияние молочнокислых бактерий на развитие слизистой оболочки рубца, выражающееся в увеличении количества ворсинок с хорошо развитой васкуляризированной структурой, способствующей лучшему всасыванию питательных веществ корма, увеличению продуктивности опытных животных.

Богдановской Ж. и соавт. (2) отобран штамм бифидобактерий, обладающих высокой антагонистической активностью и разработан способ получения препарата «Энтеробифудин». Препарат эффективен для профилактики и лечения диареи у телят, нормализует состав микрофлоры, улучшает пищеварение и предотвращает токсическое дейст-

вие продуктов метаболизма. Этот штамм полностью подавляет рост штаммов *E. coli*, выделенных от телят, больных диспепсией (5).

Одной из наиболее постоянных групп микроорганизмов в рубце жвачных животных являются амилитические стрептококки, относящиеся к виду *Str. bovis*, которые заселяют желудочно-кишечный тракт телят с первых дней жизни и, по мнению ряда авторов, могут служить индикаторами биологической полноценности рациона и нормального физиологического состояния животных. Характерной особенностью амилитических стрептококков является способность использовать как органические, так и неорганические источники азота, а также интенсивно развиваться, синтезировать витамины комплекса В, в частности витамин В₁₂, и образовывать молочную кислоту, которая служит субстратом для пропионовых кислотных бактерий. Исследованиями показано, что с помощью диеты, в сочетании с инокуляцией *Str. bovis* А024/85, наблюдается ускорение становления рубцового типа пищеварения у телят (3). Показано, что инокуляция в рубец *Str. bovis* и *Lactobacillus* 8306 не оказывает достоверного влияния на активность уреазы, протеазы, амилазы и β-глюкозидазы, а также на другие биохимические показатели содержимого рубца. Антагонистические свойства этих бактерий по отношению к патогенным и потенциально-патогенным бактериям в литературе не освещаются, тогда как по физиолого-биохимическим свойствам и ферментативному комплексу представляется перспективным использование *Str. bovis* в качестве пробиотика. Ранее нами из содержимого рубца коров были выделены, изучены и идентифицированы стрептококки, относящиеся к виду *Str. bovis*, обладающие высокой ферментативной активностью и проявляющие выраженный антагонизм по отношению к *E. coli*, выделенной от больных диспепсией телят. В связи с этим целью исследований было выяснение возможности использования *Str. bovis* с высокой витамин В₁₂-биосинтетической и протеолитической активностью при выращивании телят.

Материал и методы

Опыт проведен на двух группах телят (по 17 голов в каждой), начиная с первого дня жизни. Телятам опытной группы с целью профилактики диареи через 40-60 мин после рождения вместе с молозивом выпаивали 50 мл культуры *Str. bovis*, которую затем давали в очередное кормление в этой же дозе в течение 3 дней подряд. С лечебной целью пробиотик выпаивали в дозе 50-100 мл с небольшим количеством молока или кипяченой остуженной воды 3 раза в день до выздоровления.

Материалом для микробиологических исследований служил кал телят, в котором определяли общую протеазную активность по Ансону и амилитическую активность фотометрическим методом.

Подсчет количества амилалитических, молочнокислых, протеолитических и бактерий группы кишечной палочки проводили на соответствующих селективных питательных средах. Наличие палочек протей определяли по методу Щукевича (1).

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что в контрольной группе на 2-3 день после рождения заболело диспепсией 12 телят, или 70%. У больных животных в пищеварительном тракте уменьшилось количество молочнокислых, амилалитических и протеолитических бактерий в 2,4; 2,0 и 1,9 раза, амилалитическая и протеолитическая активности снизились в 2,7 и 2,0 раза соответственно (табл. 1). При этом численность лактозопозитивных и лактозонегативных бактерий группы кишечной палочки возросла в 1,5 и 4,4 раза, а отношение числа эшерихий к молочнокислым бактериям с 1,9:1 у здоровых контрольных животных, увеличилось до 8,9:1 – у больных. У заболевших телят отмечено появление палочек протей (10^{-3}).

Таблица 1. Микробиологическая картина кала подопытных телят

Показатели	Группа телят		
	контрольная		опытная
	клинически здоровые	с клиникой диареи	
Количество микроорганизмов различных групп, млн/г:			
амилолитических	4,93 ± 0,51	1,67 ± 0,49	17,14 ± 0,82
молочнокислых	4,64 ± 0,31	1,93 ± 0,31	6,38 ± 0,72
протеолитических	2,05 ± 0,28	1,07 ± 0,43	5,77 ± 0,64
Бактерии группы кишечной палочки, млн/мл:			
лактозопозитивные	7,52 ± 0,42	11,41 ± 0,79	4,34 ± 0,56
лактозонегативные	1,31 ± 0,24	5,71 ± 0,36	0
Ферментативная активность, ед/г:			
амилолитическая	11,71 ± 1,98	4,32 ± 0,88	23,12 ± 1,22
протеолитическая	2,92 ± 0,33	1,42 ± 0,56	6,17 ± 0,68

В опытной группе, получавшей культуру *Str. bovis*, из 17 телят заболело только 4 или 23,5%, а заболевание начиналось на 4-5 день после рождения и протекало менее остро, чем в контроле. Дача пробиотика сопровождалась увеличением количества амилалитических, молочнокислых и протеолитических бактерий в 3,5; 1,4 и 2,8 раза, а также повышением амилазной и протеазной активностей в 2,7 и 2,0 раза соответственно.

Численность лактозоположительных эшерихий при этом снизилась в 1,7 раза, лактозонегативные бактерии группы кишечной палочки и протей отсутствовали, а отношение числа эшерихий к молочнокислым бактериям составило 1:1,5.

Исследования показали, что на 30-й день после рождения в кале телят, получавших с профилактической целью пробиотик, содержание амилотических, молочнокислых и протеолитических бактерий, по сравнению с контролем, было выше в 3,1; 1,4 и 1,5 раза, а амилазная и протеазная активности в 1,4 и 1,2 раза соответственно. При этом количество бактерий группы кишечной палочки стабилизировалось на уровне контроля, а отношение числа эшерихий к молочнокислым бактериям составило 1:1 (табл. 2).

Таблица 2. Микробиологическая картина кала подопытных телят на 30-й день после рождения

Показатели	Группа телят	
	контрольная	опытная
Количество микроорганизмов различных групп, млн/г:		
амилолитических	6,08 ± 0,89	18,95 ± 1,25
молочнокислых	5,16 ± 0,76	7,26 ± 1,35
протеолитических	2,75 ± 0,63	4,21 ± 0,42
эшерихий	6,89 ± 0,87	6,28 ± 0,99
Ферментативная активность, ед/г:		
амилазная	19,90 ± 2,70	24,51 ± 1,85
протеазная	5,34 ± 0,95	7,28 ± 1,12

Заклучение

Установлено, что дача телятам с профилактической целью препарата из *Str. bovis* обеспечивает формирование в пищеварительном тракте нормального микробиоценоза, т.е. создает благоприятный фон в желудочно-кишечном тракте для развития других полезных микроорганизмов, снижает заболеваемость животных диспепсией на 47% и сокращает продолжительность болезни на 2-3 дня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина. 1982: 440.
2. Богдановская Ж.Н., Гребенко В.В., Стефанович Л.И. и др. Получение и применение препарата «Энтеробифудин» для профилактики и лечения дисбактериозов у телят. Всес. конф.: Микробиологические и биотехнологические основы интенсификации растениеводства и кормопроизводства. Алма-Ата, 1990: 12.

3. Калачнюк Г.И., Копчены Я., Шимунек И., Савка О.Г. Стимуляция рубцового пищеварения и пробиотики. Тезисы докл. международной конф.: Биологические основы высокой продуктивности с.-х. животных. Боровск, 1990, 2: 118.
4. Коваленко Н.К., Подгорский В.С., Касумова С.А. Адгезия молочнокислых бактерий к эпителию кишечника с.-х. животных. Микробиологический журнал, 1990, 52, 2: 76-79.
5. Лазарева Г.И., Богдановская Ж.Н., Гребенко В.В. и др. Антагонистическая активность бифидобактерий компонента лечебно-профилактического препарата. Всес. конф.: Микробиологические и биотехнологические основы интенсификации растениеводства и кормопроизводства. Алма-ата, 1990:12.

ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ МОЛОЧНО-КИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА ИХ АКТИВНОСТЬ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

И. А. Долгов, М.С. Долгова, В.И. Калашиник
Лаборатории пищеварения и минерального питания

*Изучено влияние лиофильного высушивания на жизнедеятельность и активность молочнокислых бактерий, относящихся к видам *Str. bovis*, *Str. lactis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*. Показано, что микроорганизмы, относящиеся к видам *L. plantarum* и *L. acidophilus* более чувствительны к лиофилизации, чем *Str. bovis* и *Str. lactis*. Выявлено влияние различных защитных сред на выживаемость бактерий при лиофилизации. Отмечено, что в начале стационарной фазы роста микроорганизмы более чувствительны к лиофилизации, чем в начале экспоненциальной и конце стационарной фаз роста. Лيوфилизированные культуры не имеют каких-либо существенных отклонений от исходных культур по морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам.*

Введение

Сохранение и поддержание полезных свойств микроорганизмов является важной задачей. При хранении культур на питательных средах в пробирках они быстро высыхают и отмирают. На частые их пересевы требуется много времени, сил и средств. При таких условиях хранения некоторые свойства и признаки бактерий подвергаются изменениям, что может обесценить коллекционные культуры. Кроме того, всегда имеется опасность потери культуры в результате вырождения и загрязнения. Лيوфилизация или высушивание под вакуумом из замороженного состояния сравнительно давно и успешно применяется при хранении микроорганизмов. В настоящее время это наиболее эффективный способ долговременного хранения микроорганизмов.

Главными факторами, определяющими выживаемость микроорганизмов при лиофильной сушке, является температурный режим и скорость замораживания, относительно влияния которых на жизнедеятельность молочнокислых бактерий и других микроорганизмов, не существует единого мнения. На степень выживаемости микроорганизмов большое влияние оказывают также защитные среды (криопротекторы), при использовании которых достигнуты значительные успехи в повышении выживаемости микроорганизмов при лиофилизации. Однако многие неспорообразующие культуры, в том числе и некоторые виды молочнокислых бактерий, плохо переносят режим лиофилизации и при консервировании этим способом имеют низкую жизнеспособность, которая падает при хранении. Микроорганизмы, особенно неустойчивые виды, при высушивании в суспензиях, не содержащих криопротекторов, подвержены значительным изменениям, которые сопровождаются не только утратой жизнеспособности, но и разрушением клеточной структуры. Кроме того, в ряде случаев процесс лиофилизации вызывает мутации у культур, что может приводить к изменению их морфологических и биохимических свойств. При низкой выживаемости культур лиофилизация может оказывать селективное действие, при этом могут отбираться клетки наиболее устойчивых вариантов, не всегда обладающие желательными свойствами. В связи с этим, при использовании сублимационной сушки микроорганизмов для обеспечения сохранности полезных генетических свойств, необходимы разработка и контроль важнейших технологических характеристик культур и периодическая поддерживающая селекция.

Задачей настоящих исследований являлось изучение влияния различных криопротекторов на выживаемость и активность молочнокислых бактерий, а также отработка оптимальных параметров лиофилизации.

Материал и методы

Объектом исследований служили чистые культуры молочнокислых бактерий, относящиеся к видам *Str. bovis*, *Str. lactis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*. Лиофилизацию культур проводили на установке ТГ-5К. Криоконсервацию микроорганизмов проводили как путем непосредственного погружения в жидкий азот, так и с использованием предварительного замораживания с медленными скоростями охлаждения. Для этого использовали культуры в начале стационарной и экспоненциальной, а также в конце стационарной фаз роста. В качестве криопротекторов преимущественно использовали сухое обезжиренное молоко в сочетании с различными углеводами и буферными солями.

Лиофилизированные культуры хранили при нерегулируемом температурном режиме и в холодильнике при 4-10°C, без доступа света

и на свету. Остаточную влажность лиофилизированных культур контролировали весовым методом для всех вариантов защитных сред путем высушивания в течение 1 ч при 100°C. Жизнеспособность культур сразу после лиофилизации и при хранении определяли методом разведений и посева на чашки Петри с последующим подсчетом числа выросших колоний. Во всех экспериментах использовано не менее трех повторностей. Амилолитическую активность культур определяли фотометрическим методом (1), а общую протеазную активность по Ансону (2).

Результаты и обсуждение

Исследованиями установлено, что выживаемость *Str. bovis*, *Str. lactis*, *L. plantarum* и *L. acidophilus* при сублимационной сушке не одинакова и находится в пределах 59-96%. Микроорганизмы, относящиеся к виду *L. plantarum* и *L. acidophilus*, более чувствительны к высушиванию (выживаемость клеток 59-68%), чем *Str. bovis* и *Str. lactis* (72-96%).

Важным фактором, влияющим на выживаемость бактерий при лиофилизации, является физиологическое состояние перед сушкой. В результате проверки жизнеспособности и активности культур, подвергшихся лиофильному высушиванию, установлено, что в начале стационарной фазы роста микроорганизмы более устойчивы к консервации (выживаемость 59-96%), чем в начале экспоненциальной (38-45%) и конце стационарной (35-51%) фазах роста (табл. 1).

Таблица 1. Влияние фазы роста на выживаемость бактерий при лиофилизации, млрд/г

Фазы роста	Виды микроорганизмов			
	<i>Str. bovis</i>	<i>Str. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>
Начало экспоненциальной				
исходная	2,35 ± 0,11	1,91 ± 0,13	2,16 ± 0,21	1,21 ± 0,19
после лиофилизации	1,06 ± 0,07	0,84 ± 0,03	0,82 ± 0,08	0,51 ± 0,04
% сохранения	45	44	38	42
Начало стационарной				
исходная	6,98 ± 0,37	4,59 ± 0,35	3,16 ± 0,25	3,68 ± 0,17
после лиофилизации	6,70 ± 0,25	2,30 ± 0,17	1,86 ± 0,09	2,50 ± 0,10
% сохранения	96	72	59	68
Конец стационарной				
исходная	7,38 ± 0,45	5,16 ± 0,18	4,72 ± 0,18	5,27 ± 0,20
после лиофилизации	3,76 ± 0,15	2,53 ± 0,27	1,49 ± 0,16	2,17 ± 0,30
% сохранения	51	49	35	42

Выживаемость микроорганизмов при высушивании в жидкой культуре без защитной среды составила 27-36%, а при использовании различных защитных сред – 59-96% (табл. 2).

При использовании в качестве защитной среды обезжиренного молока число жизнеспособных клеток при хранении в течение 6 мес при 4-10°C составило 65-72%, т.е. по мере увеличения срока хранения лиофильно высушенных культур их жизнеспособность заметно уменьшалась. Добавление к молоку 10% сахарозы или лактозы в равной степени повышало выживаемость бактерий на 12-20%, тогда как глюкоза, при идентичных условиях хранения, не оказала существенного влияния очевидно из-за наличия карбоксильных групп, оказывающих токсическое действие на микрофлору. Использование молока с сахарозой и добавлением буферных солей (лимоннокислого, уксуснокислого и фосфорнокислого натрия), которые повышают буферную емкость среды и регулируют ее реакцию при внесении бактериального концентрата, повышало выживаемость микроорганизмов на 8-17% (табл. 3).

Таблица 2. Влияние защитных сред на выживаемость микроорганизмов при хранении в холодильнике, млрд/г

Защитные среды	Виды микроорганизмов			
	<i>Str. bovis</i>	<i>Str. lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>
Исходная	9,24 ± 0,56	8,21 ± 0,78	4,31 ± 0,32	4,97 ± 0,43
Без защитной среды	3,05 ± 0,71	2,95 ± 0,61	1,21 ± 0,41	1,34 ± 0,29
Молоко	6,65 ± 0,21	5,83 ± 0,17	2,80 ± 0,21	3,48 ± 0,34
Молоко + сахароза	7,76 ± 0,68	7,06 ± 0,31	3,66 ± 0,17	4,17 ± 0,27
Молоко + лактоза	7,85 ± 0,33	7,22 ± 0,44	3,58 ± 0,28	4,27 ± 0,42
Молоко + глюкоза	6,38 ± 0,68	4,81 ± 0,72	1,98 ± 0,04	3,06 ± 0,31

Таблица 3. Влияние буферных солей на выживаемость микроорганизмов, млрд/г

Защитная среды	Виды микроорганизмов			
	Str. bovis	Str. lactis	L. plantarum	L. acidophilus
Молоко + сахароза	6,98 ± 0,72	7,01 ± 0,51	3,21 ± 0,25	3,78 ± 0,56
Молоко + сахароза + лимоннокислый натрий	8,03 ± 0,72	8,20 ± 0,68	3,35 ± 0,24	4,12 ± 0,38
Молоко + сахароза + уксуснокислый натрий	6,35 ± 0,52	6,87 ± 0,29	3,66 ± 0,31	4,42 ± 0,37
Молоко + сахароза + фосфорнокислый натрий	7,68 ± 0,55	7,57 ± 0,38	3,50 ± 0,28	4,08 ± 0,36

Следует отметить, что после сушки и хранения не обнаружено каких-либо отклонений в морфологических свойствах по сравнению с исходными культурами. Форма, величина и расположение клеток, а также величина колоний при их восстановлении и высеве на среды оставались неизменными. Культуры сохраняли способность ферментировать определенные углеводы. Протеолитическая активность исследуемых микроорганизмов после сушки не изменялась, за исключением *Str. bovis*, у которого наблюдалось небольшое ее повышение. В результате лиофильного высушивания стрептококков, относящихся к виду *Str. bovis* наблюдалось заметное снижение амилазной активности (с 36,7 до 28,1 ед/г). В процессе дальнейшего хранения в лиофильном состоянии она продолжала постоянно падать.

Стабильность титра бактерий в сухом препарате, кроме защитной среды, зависит также от условий хранения препарата. При хранении сухого препарата в условиях нерегулируемого температурного режима (15-25°C) в темном помещении через 1 месяц сохранялось около 75-80%, через 3 мес – 60-70% и через 6 мес – 50-60% жизнеспособных бактерий (табл. 4).

Таблица 4. Сохранность бактерий в темном помещении при нерегулируемом температурном режиме

Бактерии	Титр клеток, млрд/г			
	исходный	длительность хранения, мес		
		1	2	3
<i>Str. bovis</i>	6,77 ± 0,61	5,42 ± 0,48	4,74 ± 0,39	4,06 ± 0,40
<i>Str. lactis</i>	5,07 ± 0,43	3,95 ± 0,67	3,40 ± 0,45	2,79 ± 0,32

<i>L. plantarum</i>	3,14 ± 0,35	2,35 ± 0,28	1,85 ± 0,19	1,66 ± 0,12
<i>L. acidophilus</i>	4,11 ± 0,51	3,12 ± 0,31	2,47 ± 0,21	2,05 ± 0,17

При хранении препаратов в условиях холодильника падение титра клеток отмечено лишь через 6 мес (табл. 5).

Таблица 5. Количество жизнеспособных бактерий, хранящихся при 4-10°C

Бактерии	Титр клеток, млрд/г			
	исходный	длительность хранения, мес		
		1	2	3
<i>Str. bovis</i>	6,05 ± 0,71	6,35 ± 0,42	5,67 ± 0,54	5,28 ± 0,34
<i>Str. lactis</i>	4,49 ± 0,55	5,07 ± 0,33	4,13 ± 0,35	3,48 ± 0,27
<i>L. plantarum</i>	2,78 ± 0,21	2,66 ± 0,14	2,43 ± 0,19	2,41 ± 0,15
<i>L. acidophilus</i>	3,96 ± 0,28	4,12 ± 0,23	4,05 ± 0,33	3,14 ± 0,52

Выживаемость лиофилизированных бактерий при хранении на свету при нерегулируемом температурном режиме через 1 мес составляла 40-50%, через 3 мес – 20-27%, а затем гибель клеток заметно возрастала. По нашим наблюдениям, замораживание суспензии микроорганизмов в защитной среде при исследуемых режимах (ультрабыстрый способ и медленное замораживание) существенно не влияло на выживаемость клеток.

Заключение

На выживаемость молочнокислых бактерий, относящихся к видам *Str. bovis*, *Str. lactis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* сразу после лиофилизации, а также в процессе хранения существенное влияние оказывают состав защитной среды, фаза роста, температурные условия хранения и световой фактор. При лиофилизации предлагается оптимальная защитная среда следующего состава: 10%-ный раствор сахарозы или лактозы в обезжиренном молоке с добавлением 5% лимоннокислого и уксуснокислого натрия соответственно для молочнокислых стрептококков и молочнокислых палочек. Замораживание в защитной среде следует осуществлять при -40°C и выдерживать при указанной температуре 20 ч, сушку суспензии бактерий проводить при начальной температуре -30°C, досушивание при 32-35°C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгов И.А. Определение амилазной активности крахмалгидролизующих бактерий фотометрическим методом. Изучение микрофлоры преджелудков у жвачных. Методические указания, Боровск, 1977: 40.

2. Anson M.Z. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Wen. Physiol., 1938, 22: 79-82.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ РАННЕГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ МЯСНЫХ И ОТКОРМОЧНЫХ КАЧЕСТВ СВИНЕЙ

*С.Г. Кузнецов, В.И. Дудин, В.А. Матвеев, А.И. Манухина, С.Н. Аитов,
В.Д. Омельченко, М.Д. Аитова, Р.А. Волобуева, Е.Е. Комкова, О.А. Крюков*
*Лаборатории белково-аминокислотного питания, минерального
питания,
витаминого питания, эндокринной регуляции метаболизма, об-
мена энергии, иммунобиотехнологии, кабинет морфологических
исследований*

Изучены закономерности роста и развития костной, мышечной, жировой ткани, желез внутренней секреции, отдельных органов поросят крупной белой породы и их помесей с породой дюрок от отъема до конца откорма; получены данные по формированию откормочных и мясных качеств свиней разного потенциала продуктивности; выяснены особенности азотистого, липидного, минерального и витаминного обмена, гормонального статуса, стресс-устойчивости и формирования неспецифической резистентности организма свиней на отдельных этапах онтогенеза; предложен комплекс биохимических тестов раннего (в возрасте 30-105 суток) прогнозирования мясных и откормочных качеств свиней.

Введение

Известно, что в производстве и потреблении мяса свинина занимает одно из ведущих мест и составляет около 40% его производства (4, 12). Более 70% свинины идет на переработку – на колбасные изделия, консервы и мясные полуфабрикаты (4). Высоких показателей в свиноводстве можно достичь за счет обеспечения животных высококачественными кормами, применения современных технологий кормопроизводства, эффективного использования поголовья и совершенствования селекционно-племенной работы, т.е. улучшения существующих и выведения новых пород, применения скрещивания и гибридизации (7, 11-13). Откормочные качества и мясная продуктивность свиней определяются генетическими факторами, условиями окружающей среды, взаимодействием генотипа и среды. Установлено, что скорость роста

свиней в большей степени зависит от условий кормления, а мясная продуктивность – от генетических особенностей животных (4, 5).

Один из путей увеличения производства и улучшения качества свинины – широкое применение межпородного скрещивания. Этот метод разведения позволяет эффективно и быстро использовать желательные человеку качества животных, накопленные в результате длительной селекции. Кроме того, комбинация различных генов обеспечивает гетерозис, т.е. усиление жизнеспособности и повышение продуктивности свиней по сравнению с исходными родительскими формами. Однако эффект скрещивания проявляется по-разному и зависит от породы, степени генетической обусловленности признаков, их сочетаемости, условий кормления и содержания животных и т.д. (1, 3, 5, 7).

В многочисленных опытах показано, что наибольший эффект по признакам откормочной и мясной продуктивности получен при скрещивании маток крупной белой породы с хряками породы дюрок. Однако положительный эффект по продуктивности маток от скрещивания этих двух пород наблюдается не всегда (4, 5, 7, 10).

Для оценки способов повышения генетического потенциала свиней возникает необходимость в разработке методов, позволяющих более быстрыми темпами отбирать генотипы животных с высокой продуктивностью. В частности, одним из элементов таких методов может быть использование биохимических тестов для раннего прогнозирования мясных качеств животных – скорости роста, способности к формированию мышечной и жировой ткани, эффективности использования корма. Известно, что различия в генотипе у животных с разным потенциалом продуктивности находят отражение в функционировании регуляторных систем организма. Это, в свою очередь, сопровождается изменениями в интенсивности и направленности метаболических процессов, в результате чего растущие и откармливаемые животные с разной скоростью наращивают мясную и жировую ткань, неодинаково используют питательные вещества корма на прирост.

В качестве биохимических тестов раннего прогнозирования мясных качеств свиней используют показатели углеводного обмена, активности некоторых ферментов (например, аминотрансфераз, креатинфосфокиназы плазмы крови), гормонального статуса, иммунной системы и др. (2, 3, 5, 10). Однако практическое использование этих исследований в значительной степени тормозится отсутствием достаточной информации о роли отдельных биохимических показателей и их комбинаций в формировании и реализации продуктивного потенциала животных.

В связи с вышеуказанным перед нами была поставлена задача изучить микро- и макроморфометрические особенности роста и развития организма, костной, мышечной, жировой ткани, желез внутренней секреции, отдельных органов поросят крупной белой породы и их по-

месяц с породой дюрок от отъема до конца откорма; выяснить закономерности азотистого, липидного, минерального и витаминного обмена, гормонального статуса, стресс-устойчивости и формирования неспецифической резистентности организма свиней на отдельных этапах онтогенеза; установить особенности формирования откормочных и мясных качеств свиней разного потенциала продуктивности; определить корреляционную зависимость между различными показателями мясной продуктивности и изучаемыми биохимическими параметрами организма на отдельных этапах постнатального онтогенеза и на основе этих данных предложить комплекс биохимических тестов раннего прогнозирования мясных и откормочных качеств свиней.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи в виварии института был проведен комплексный опыт на свиньях крупной белой породы и их помесях с дюрками в периоды доращивания и откорма. Поросят отняли от маток в возрасте 45 суток и затем сформировали по принципу парных аналогов две группы: животные крупной белой породы – 15 голов (9 свинок и 6 боровков) и помесные животные – 20 голов (11 свинок и 9 боровков). Содержание поросят групповое, поение из автопоилок. Кормление животных обеих групп было одинаковым. Комбикорм состоял из кукурузы, ячменя, овса, соевого шрота, подсолнечного жмыха, сухого обрата, масла подсолнечного или жира кормового, поваренной соли, трикальцийфосфата, известняковой муки, премиксов П 51-1 и П 52-1. Убой животных проводили в возрасте 30 суток (подсосные поросята, по 3 головы из группы), 108 суток (по 5 голов), 208 суток (по 3 головы). Опыт продолжался 163 дня.

Результаты и обсуждение

Показатели продуктивности свиней приведены в табл. 1. В первый месяц опыта рацион животных был недостаточно сбалансирован по основным питательным веществам и энергии, а далее рационы соответствовали существующим нормам. В первый месяц кормления интенсивность роста помесных поросят в возрасте 45-60 суток была в 2,5 раза ниже по сравнению с чистопородными животными. Далее темпы роста помесных свиней были постоянно выше, чем у крупной белой

Таблица 1. Показатели продуктивности свиней разного возраста и генотипа

<i>Возраст, сут</i>	<i>Порода</i>	
	<i>крупная белая</i>	<i>крупная белая х дюрок</i>

<i>Живая масса, кг</i>		
45	8,40±0,28	8,86±0,35
60	10,09±0,29	9,55±0,40
105	30,22±1,02	31,05±1,10
153	55,62±2,11	60,50±2,10*
208	96,20±4,34	102,13±4,96
<i>Среднесуточный прирост, г</i>		
45-60	112±11	46,0±8,5*
45-105	364±37	370±39
45-208	539±62	572±27
61-105	447±23	477±18*
106-153	559±29	614±47
154-208	738±35	757±42
<i>Потребление корма: (1) – кг, (2) – кг/сут</i>		
45-208 (1)	308,8	309,2
45-208 (2)	1,88	1,89
<i>Затраты корма на 1 кг прироста, кг:</i>		
45-60	3,59	8,78*
45-105	2,82	2,78
45-208	3,51	3,31
61-105	2,76	2,59
106-153	3,59	3,10*
154-208	3,85	3,75
<i>Возраст при достижении живой массы 100 кг</i>	216	204

*Примечание: * – здесь и далее разница между группами статистически достоверна*

породы (на 2,6-9,8%). Потребление корма животными обеих групп было одинаковым (309 кг на 1 голову за опыт или 1,9 кг/сут). Эффективность использования корма в первые две недели опыта у помесных поросят оказалась в 2,5 раза ниже, далее она была у них стабильно выше (на 2,6-13,6%) по сравнению с крупной белой породой. В целом за опыт прирост живой массы у помесного молодняка был выше на 33 г/сут или на 6,1% ($P > 0,05$), эффективность использования корма – на 5,7%, при одинаковом потреблении корма. Живая масса в конце опыта у помесей оказалась выше на 6 кг, а возраст достижения массы тела 100 кг – на 12 суток меньше по сравнению с чистопородными животными.

В месячном возрасте помесные поросята имели более низкие показатели всех промеров и индексов телосложения, в 105 сут возрасте они уже превосходили своих сверстников по высоте в холке, а в конце откорма – по всем промерам, индексам сбитости и широтному (табл. 2, 3). Известно, что линейные промеры у молодняка свиней имеют положительную корреляцию с живой массой, исходя из чего составлены таблицы по ее определению. Индексы телосложения более наглядно показывают экстерьерные типы молодняка свиней. Каждому направле-

нию продуктивности соответствует экстерьерный тип специализированных пород или линий внутри породы. У молодняка в период выращивания могут значительно варьировать основные параметры скорости: линейные промеры, экстерьерный тип и отдельные индексы телосложения. В частности, индекс сбитости является показателем развития массы тела, поэтому наиболее высокие значения этого признака наблюдаются у мясных и сальных пород свиней, а в нашем опыте – у помесных животных.

Таблица 2. Промеры свиней разного возраста и генотипа

Промеры , см	30 сут		105 сут		200 сут	
	кр.белая порода	кр.белая х дюркок	кр.белая порода	кр.белая х дюркок	кр.белая порода	кр.белая х дюркок
Живая масса, кг	6,98±0,23	6,38±0,19	34,0±2,0	33,9±3,6	96,2±4,0	102,1±4,7
Длина туловища	38,5±0,5	36,5±0,3*	77,0±2,7	75,2±3,4	109,1±1,6	113,9±4,7
Высота в холке	30,3±0,4	30,0±0,6	55,6±4,0	57,1±1,6	68,5±1,1	70,9±1,2
Обхват груди	42,2±0,2	40,3±0,3*	78,2±2,2	76,9±1,3	112,3±2,1	117,8±1,8
Обхват пясти	8,7±0,2	8,2±0,1*	13,0±0,3	12,8±0,7	17,3±0,3	17,9±0,3

Таблица 3. Индексы телосложения свиней

Индексы	30 сут		105 сут		200 сут	
	кр.белая порода	кр.белая х дюркок	кр.белая порода	кр.белая х дюркок	кр.белая порода	кр.белая х дюркок
Растянутости	127,0 ±3,5	121,7 ± 1,4	138,7 ± 4,0	131,5 ± 3,3	159,5 ± 2,7	160,7 ± 1,6
Сбитости	139,1 ± 2,0	134,5 ± 2,8	141,1 ± 5,4	134,4 ± 3,1	164,0 ± 3,1	166,2 ± 1,1
Костистости	28,6±1,0	27,2±0,3	22,4±1,5	22,4±1,0	25,2±0,4	25,3±2,1
Широтный	10,2±0,2	9,6±0,2	25,2±0,9	25,3±1,9	54,0±1,8	55,1±0,3

По результатам контрольного убоя подопытных животных достоверных различий в изучаемых показателях мы не обнаружили, хотя тенденции прослеживаются довольно четко. У чистопородных поросят в возрасте 30 и 107 суток был существенно выше убойный выход и выход костей, а у помесных животных в это время был больше выход мя-

са. В конце откорма картина изменилась. Помесные животные уже превосходили чистопородных по убойному выходу на 2% и выходу костей на 3,5%, а чистопородные превосходили помесных по выходу жира на 2,7% и выходу мяса на 0,8%. В месячном возрасте помесные животные имели лучшее развитие внутренних органов (по их абсолютной и относительной массе), а в месячном возрасте эта закономерность сменилась на противоположную. В конце откорма помесные животные значительно уступали чистопородным по массе печени, легких, сердцу, но несколько превосходили их по развитию селезенки и почек (табл. 4).

Таблица 4. Масса внутренних органов свиней

Органы, кг	30 сут		107 сут		208 сут	
	кр.белая порода	кр.белая х дюрок	кр.белая порода	кр.белая х дюрок	кр.белая порода	кр.белая х дюрок
Печень	$0,148 \pm 0,008/2,1$	$0,168 \pm 0,002*/2,6$	$0,75 \pm 0,06/2,2$	$0,80 \pm 0,08/2,1$	$1,50 \pm 0,07/1,5$	$1,26 \pm 0,10*/1,3$
Легкие	$0,078 \pm 0,007/1,1$	$0,088 \pm 0,005/1,4$	$0,32 \pm 0,02/0,9$	$0,34 \pm 0,04/0,9$	$0,60 \pm 0,14/0,6$	$0,51 \pm 0,04/0,5$
Сердце	$0,003 \pm 0,001/0,4$	$0,032 \pm 0,002/0,5$	$0,18 \pm 0,02/0,5$	$0,17 \pm 0,01/0,5$	$0,38 \pm 0,02/0,4$	$0,29 \pm 0,02*/0,3$
Почки	$0,028 \pm 0,002/0,4$	$0,034 \pm 0,001/0,5$	$0,14 \pm 0,01/0,4$	$0,15 \pm 0,02/0,4$	$0,29 \pm 0,04/0,3$	$0,29 \pm 0,02/0,3$
Селезенка	$0,01 \pm 0,001/0,14$	$0,012 \pm 0,002/0,2$	$0,051 \pm 0,006/0,15$	$0,052 \pm 0,004/0,14$	$0,15 \pm 0,01/0,15$	$0,16 \pm 0,02/0,17$

Примечание: в знаменателе – доля органа от массы тела

По физико-химическим показателям качества мяса (рН, влагоудерживающая способность, нежность, интенсивность окраски) помесные животные превосходили чистопородных как в 107-, так и в 208-сут возрасте, что согласуется с данными литературы. Однако по биологической полноценности белков мяса (отношение триптофана к оксипролину) помесные свиньи уступали чистопородным на 9%, хотя разница была недостоверной (табл. 5).

Таблица 5. Физико-химические показатели качества мяса свиной

Показатели	107 сут		208 сут	
	кр. белая	кр. белая	кр. белая	кр. белая
	порода	х дюрок	порода	х дюрок
<i>pH</i> через 1,5 ч	6,45±0,05	6,47±0,02	6,30±0,03	6,49±0,06*
<i>pH</i> через 12 ч	–	–	5,95±0,04	5,98±0,07
<i>pH</i> через 24 ч	6,27±0,05	6,27±0,04	5,64±0,21	5,92±0,04*
Влагодерживающая способность, %	72,0±4,6	81,3±4,4	75,8±6,5	85,7±6,6
Нежность мяса, см ² /г	1145±25	1230±20*	1197±61	1234±14
Интенсивность окраски, ед. экстинкции x 1000	89,4±13,0	92,2±9,0	73,0±3,7	76,5±5,4
Отношение триптофана к оксипролину	–	–	1,96±0,07	1,78±0,10

По вкусовым качествам бульон и вареное мясо помесных поросят 107-сут возраста значительно уступали чистопородным, однако к концу откорма небольшая разница между группами сохранилась только по качеству бульона. Следует отметить, что с увеличением возраста животных вкусовые качества мяса у помесных свиной улучшались более выражено по сравнению с материнской породой.

Как следует из табл. 6, положительная и высокодостоверная корреляционная зависимость обнаружена между живой массой, выходом мяса и концентрацией саркоплазматических белков в длиннейшей мышце спины. Менее тесная связь найдена между указанными хозяйственно полезными качествами и белками стромы длиннейшей мышцы спины ($r = +0,8$). Вместе с тем стромальные белки длиннейшей мышцы спины наиболее тесно коррелировали с содержанием в ней общего белка ($r = +0,9$). Положительная и вполне объяснимая зависимость обнаружена между выходом мяса и концентрацией креатинина в крови, который играет важную роль в энергетике мышечной ткани.

Нами обнаружена тесная корреляционная связь между активностью щелочной фосфатазы в плазме крови и выходом мяса ($r = -0,8$). Такая же зависимость была между активностью этого фермента у поросят 30-сут возраста и выходом мяса у свиной в конце откорма.

Таблица 6. Коэффициенты корреляции биохимических показателей с откормочными и мясными качествами свиней

Показатели	Живая масса	Средне-сут. прирост	Убойный выход	Масса мяса	Масса костей	Масса жира	Окраска мяса	Качество вареного мяса	Белок в ДМС
Гемоглобин	+0,5	+0,6	+0,6	+0,5			-0,6		
Гематокрит	+0,7	+0,6	+0,8	+0,7			-0,6		
Церулоплазмин ПК	+0,9	+0,9	+0,9	+0,9			-0,9		
Са в костях					+0,9				
Фосфор в костях					+0,5				
Прочность костей					+0,9				
Железо в ДМС							-0,8		
Щелочная фосфатаза СК	-0,8			-0,8	+0,6				-0,7
Саркоплазматические белки ДМС	+0,9			+0,9					+0,8
Стромальные белки ДМС	+0,8			+0,8					+0,9
Креатинин ПК	+0,8			+0,8					
Аспаратамино-трансфераза ПК	-0,3								
Рибофлавин в эритроцитах	+0,7			+0,7	+0,7	+0,6			
Ниацин в моче	+0,9			+0,9	+0,9	+0,7			
НЭЖК в ПК	+0,8			+0,8	+0,8	+0,7			
Кортизол СК	-0,5	-0,6	-0,5	-0,4	-0,5	-0,7		-0,6	
Трийодтиронин СК	-0,3							-0,3	
Антиоксидантная активность ПК	+0,8	+0,9	+0,7	+0,6	-0,9				

Примечание: ПК – плазма крови, СК – сыворотка крови, ДМС – длиннейшая мышца спины, НЭЖК – неэстерифицированные жирные кислоты. В таблице представлены средние данные за период 30-208 суток.

Следовательно, щелочную фосфатазу крови можно использовать в качестве биохимического теста раннего прогнозирования мясных качеств свиней. Для этой цели вполне подходит и концентрация белков стромы длиннейшей мышцы спины. По концентрации саркоплазматических белков в скелетной мышце можно судить об интенсивности в ней биосинтетических процессов и формирования мясной продуктивности свиней. В отличие от других исследователей, мы не обнаружили достоверной корреляционной связи между активностью аминотрансфераз крови и откормочными качествами свиней.

Показатели концентрации витамина В₂ в эритроцитах, ниацина в моче и НЭЖК в плазме крови положительно и достоверно коррелировали с живой массой, массой мышц, костей и жира. Активность церулоплазмينا в плазме крови помесных свиней была во все периоды

опыта выше, особенно в возрасте 1 и 7 месяцев, по сравнению с чистопородными животными. Этот показатель вполне годится в качестве биохимического теста раннего прогнозирования откормочных качеств свиней. Церулоплазмин играет важную роль в обмене меди и железа, синтезе цитохромов, гемоглобина и миоглобина, в защитных реакциях организма (6).

Определение функционального состояния коры надпочечников проводили в 2-месячном возрасте у 8 животных из каждой группы с помощью нагрузки кортикотропином. На основании данных концентрации кортизола через 1 ч после первой и второй нагрузки рассчитывали индекс активности коры надпочечников (индекс Какн). По величине индекса Какн животных условно делили на стрессустойчивый тип (индекс больше 1) и стрессчувствительный тип (индекс меньше 1). У поросят с высоким потенциалом функции коры надпочечников концентрация кортизола в сыворотке крови была значительно выше, чем у животных с более низкими функциональными резервами. Половина животных крупной белой породы и 71% помесных поросят имели индекс Какн больше 1, т.е. были отнесены к стрессрезистентному типу. Из табл. 7 видно, что независимо от генотипа животные этого типа росли более интенсивно. Следовательно, животные с высоким потенциалом коры надпочечников более адекватно реагируют на неблагоприятное воздействие стресс-факторов, в результате чего у них меньше распадается белков и липидов для обеспечения адаптационного процесса, что в конечном итоге способствует проявлению более высокой продуктивности.

Таблица 7. Интенсивность роста поросят с разным потенциалом функции коры надпочечников

Показатели	Порода			
	крупная белая		крупная белая х дюрок	
	стрессустойчивые	стрессчувствительные	стрессустойчивые	стрессчувствительные
Индекс Какн	>1,0	<1,0	>1,0	<1,0
Живая масса в 105 сут., кг	29,8±2,0	26,3±2,9	32,7±2,6	26,1±1,5
Прирост ж.м. за период 45-105 сут., г/сут	380±16	290±57	392±26	326±16

Корреляционный анализ показал, что внутри каждой породы животных наблюдались существенные индивидуальные различия по большинству показателей. В отличие от тиреоидных гормонов, кортизол имел более тесную корреляционную связь с рядом показателей, ко-

торая наблюдалась как внутри каждой группы, так и в целом по всем животным. Связь концентрации кортизола с большинством изученных показателей была отрицательной. У животных, которые сильно реагировали на различные раздражители усилением секреции кортизола, наблюдалось снижение интенсивности роста, уменьшение массы туши и ухудшение качества мяса. У помесных животных отрицательная взаимосвязь концентрации кортизола с продуктивными качествами была в основном выражена сильнее, чем у чистопородных. Наиболее тесно этот показатель коррелировал с приростом массы тела, массой жира, величиной рН мяса через 1,5 ч выдержки с качеством вареного мяса ($r = -0,6... - 0,7$).

Исследования показали, что помесный молодой свиней (крупная белая х дюрк) отличается большей интенсивностью роста и лучшей конверсией корма на прирост, однако он более требователен к условиям кормления, особенно в раннем возрасте, чем животные крупной белой породы. В 1-мес возрасте помесные поросята имели более низкие показатели развития тела, однако к концу откорма уже превосходили своих сверстников крупной белой породы по всем промерам, индексам сбитости и широтному. Помесные животные в конце опыта имели существенные преимущества по убойному выходу и массе костей, чистопородные – по выходу жира. В месячном возрасте помесные свиньи отличались лучшим развитием внутренних органов, а в конце откорма они значительно уступали чистопородным по массе печени, легких, сердцу.

По физико-химическим показателям качества мяса (рН, влагосодерживающая способность, нежность, интенсивность окраски) помесные животные превосходили чистопородных как в 107-, так и в 208-сут возрасте. Однако по биологической полноценности белков мяса (отношение триптофана к оксипролину) они уступали чистопородным на 9%. По вкусовым качествам бульон и вареное мясо помесных поросят 107-сут возраста имели более худшие показатели по сравнению с чистопородными животными, однако к концу откорма небольшая разница между группами сохранилась только по качеству бульона. Следует отметить, что с увеличением возраста животных вкусовые качества мяса у помесных свиней улучшались более выраженно по сравнению с материнской породой. Ухудшение вкусовых качеств мяса у помесей было связано, очевидно, с изменением фракционного состава белков (уменьшение миофибриллярных и увеличение стромальных белков), уменьшением количества триптофана, липидов и энергии в мышцах.

Абсолютные промеры и индексы макроморфометрии бедренной кости у 1- и 3,5-мес поросят обеих групп не имели существенных отличий. Однако в конце опыта бедренная кость помесных поросят отличалась большей абсолютной и относительной массой, массивностью, ши-

риной проксимального эпифиза, периметром и шириной диафиза, меньшей расширенностью эпифизов.

Механические параметры пястных костей 1-мес поросят крупной белой породы были в целом значительно выше, чем у их помесных сверстников. К 3,5-мес возрасту эта разница сгладилась, а к концу откорма у помесных свиней показатели прочности пястных костей на излом, момента изгиба и толщины костных стенок оказались существенно выше, чем у животных крупной белой породы. Такая же динамика отмечена в отношении концентрации Са и Р в костной ткани.

Проведенные морфологические исследования показали, что структура эндокринных желез и лимфоидных органов меняется с возрастом и имеет межпородные отличия. В аденогипофизе у помесей было повышенное количество соматотропоцитов, что сопровождалось более высоким уровнем секреции соматотропного гормона, который, в свою очередь, усиливал морфофункциональную активность тироцитов и инсулиноцитов. Более высокая морфофункциональная активность эндокринных желез двухпородных помесей обеспечивала интенсивный рост и развитие органов иммунной системы, что наглядно показано на примере тимуса.

Общая антиоксидантная активность была наиболее низкой у 30-сут поросят. У помесных животных она была во все возрастные периоды выше, чем у чистопородных. Показатели перекисного окисления липидов в тканях и неспецифической резистентности организма существенно не зависели от генотипа животных.

У поросят с высоким потенциалом функции коры надпочечников концентрация кортизола в сыворотке крови была значительно выше, чем у животных с более низкими функциональными резервами. Половина животных крупной белой породы и 71% помесных поросят были отнесены к стрессрезистентному типу. Независимо от породы, свиньи этого типа росли более интенсивно. Животные с высоким потенциалом коры надпочечников более адекватно реагировали на неблагоприятное воздействие стресс-факторов, в результате чего у них меньше распадались белков и липидов для обеспечения адаптационного процесса, что в конечном итоге способствовало проявлению высокой продуктивности.

Для помесных животных характерно более высокое содержание глюкозы в сыворотке крови как в 107-, так и 208-сут. возрасте. В конце откорма у этих животных концентрация тиреоидных гормонов достоверно снижалась, а уровень кортизола возрастал. В месячном возрасте помесные поросята менее эффективно использовали азотистые вещества в тканевом метаболизме, однако к 105 суткам они уже по этому показателю превосходили чистопородных животных. Хотя помесные свиньи, к концу периода откорма, и опережали чистопородных по приросту и выходу мяса, у них снова появилась тенденция к снижению эффективности использования азотистых веществ в организме.

У помесных свиней по сравнению с чистопородными, очевидно, имела место более эффективная мобилизация липидов из жировых депо. В возрастном аспекте отмечалось стабильное увеличение концентрации НЭЖК в плазме крови свиней обеих групп. НЭЖК является одним из основных показателей, характеризующих состояние энергетического обмена у животных. У помесей концентрация НЭЖК, так же как и общих липидов в плазме крови, в 30- и 107-сут возрасте была существенно выше, а в конце откорма – несколько ниже по сравнению с чистопородными животными. В конце опыта активность липопротеидлипазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы и малатдегидрогеназы была выше у помесных животных, что может свидетельствовать о существовании тенденции к усилению липидного синтеза в жировой ткани.

У помесных поросят в месячном возрасте содержание энергии (как относительное, так и абсолютное) в печени, мышечной ткани и цельной крови было достоверно выше, чем у их сверстников крупной белой породы. К 107-сут возрасту эта разница была статистически значима только в отношении крови и гомогената целого организма. К концу откорма в мышечной ткани и печени помесных поросят уже содержалось меньше энергии, что хорошо согласуется с содержанием в них жира.

Содержание витаминов А, Е, В₂ и В₅ существенно не зависело от генотипа животных. Интенсивность гемопоэза у помесных поросят 30-сут возраста была достоверно ниже, чем у сверстников материнской породы и эта закономерность сохранялась до 3,5 месяцев. В конце опыта показатели гемоглобина и гематокрита у помесей были достоверно выше, что тесно коррелировало с интенсивностью роста и адаптацией животных к условиям кормления. Активность церулоплазмينا в плазме крови помесных свиней была во все периоды опыта выше, особенно в возрасте 1 и 7 месяцев, по сравнению с чистопородными животными.

У помесей значительно устойчивее, чем у чистопородных животных, присутствовали в крови фракции эритроцитов с диаметром от 3,4 до 4,3 мкм. Возможно, это связано с менее интенсивным транспортом кислорода кровью, что сопровождалось замедленным разрушением старых, более мелких эритроцитов. В пользу этого объяснения свидетельствует большее накопление энергии в организме поросят-помесей. В возрастном аспекте у поросят обеих групп отмечено достоверное увеличение доли наиболее многочисленных средних по размеру фракций с диаметром от 4,8 до 6,0 мкм, причем у помесей этот процесс был более выражен. По-видимому, данное явление представляет собой возрастную перестройку стабилизации размерного спектра эритроцитов на фоне снижения удельной интенсивности окислительных процессов в организме.

С увеличением возраста животных от 30 до 208 суток отмечено повышение концентрации Са, Р, Mg в костной ткани, Mn – в мышеч-

ной, Mg, Fe – в печени, Na, Mg, Zn, Mn, Fe – в почках, Na, Ca, Zn, Fe – в стенке тонкого кишечника, а также уменьшение концентрации K, P, Mg в мышечной ткани, K, P, Zn, Cu – в печени, K, Mg, Cu – в стенке кишечника. На возрастную динамику содержания отдельных минеральных элементов в изученных органах и тканях влияет и генотип животного. В возрасте 30 суток отмечена достоверная разница в концентрации Na, Zn, Cu в мышечной ткани, Na, K, Cu, Fe – в печени, Ca, Cu – в почках, Mg, Zn, Cu, Mn – в стенке кишечника животных разного генотипа. В конце откорма помесные свиньи отличались более высокой концентрацией Na, Zn, Mn, Fe в мышцах, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Fe – в печени, Mn, Fe – в почках, Na, Ca, Mg, Zn, Mn, Fe – в стенке кишечника. В то же время для помесных свиной была характерна более низкая концентрация меди в стенке тонкого кишечника во все возрастные периоды по сравнению с чистопородными животными.

Заключение

Показатели активности церулоплазмينا, щелочной фосфатазы, антиоксидантной активности, содержания креатинина, кортизола, НЭЖК в плазме крови, ниацина в моче, рибофлавина в эритроцитах, гемоглобина и гематокрита в крови, саркоплазматических белков и энергии в мышцах следует использовать в селекционной работе для раннего прогнозирования (в возрасте 30-107 суток) откормочных и мясных качеств свиной. По активности церулоплазмينا, щелочной фосфатазы, концентрации кортизола в крови, содержанию железа, саркоплазматических и стромальных белков в мышце можно судить о качестве свиной (табл. 6). Содержание кальция в костях тесно и положительно коррелирует с их массой и прочностью на излом. При бонитировке животных целесообразно делать промер обхвата пясти для предсказания прочности кости. Биохимические показатели для раннего прогнозирования мясных и откормочных качеств свиной представлены в таблице 8.

Таблица 8. Биохимические показатели для раннего прогнозирования мясных и откормочных качеств свиной (пределы колебания в норме)

Показатели	Возраст поросят, сут	
	30	107
I	2	3
Щелочная фосфатаза плазмы крови, мккат/л	1,3-1,5	1,2-1,3
Церулоплазмин плазмы крови, мкМ парафенилендиамина/ч/мл	23-35	23-28
Антиоксидантная активность плазмы крови, %	48-65	70-80
Креатинин плазмы крови, мкмоль/л	45-70	35-50
Кортизол, нмоль/л		37-47

Неэстерифицированные жирные кислоты плазмы крови, мкг.экв./л		370-425
Гемоглобин, г/ цельной крови	127-147	128-143

продолжение таблицы 8

1	2	3
Гематокрит в цельной крови, %	37-43	38-45
Саркоплазматические белки длин. мышцы спины, г%	7,3-7,8	7,6-8,4
Стромальные белки длин. мышцы спины, г%	1,3-2,0	2,4-2,8
Железо, мг/кг сухой мышечной ткани	100-150	65-80
Энергия, МДж/г сухой мышечной ткани	-22-24	25-26
Рибофлавин в эритроцитах, мкг/мл	0,07-0,09	0,14-0,17
Ниацин в моче, мкг/мл	2,4-2,6	2,6-2,9
Кальций в бедренной кости, % на сухую обез- жиренную ткань	14-16	20-22
Прочность пястных костей на излом, кг/см	32-55	78-92
Обхват пясти, см	8-9	12-14

Показатель функционального состояния коры надпочечников также следует использовать для раннего прогнозирования скорости роста свиней (при индексе Какн больше единицы животные стрессустойчивы и растут более интенсивно).

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева Э.Г., Ситникова Н.Ф. Селекция свиней при создании гибридов. Зоотехния, 1997, 10: 8-11.
2. Гуткович Я.Л. Прогнозирование зольного состава кормов, продуктивности свиней и потребности их в некоторых минеральных элементах в условиях Среднего Поволжья. Автореф. дис... д. с.-х. н. Ленинград – Пушкин, 1991: 45.-
3. Иващук И.С. Эффективность скрещивания в свиноводстве. Зоотехния, 1997, 10: 12-13.
4. Кабанов В.Д. Повышение продуктивности свиней. М., 1983: 256.
5. Козловский В.Г., Лебедев Ю.В., Тонышев И.И. Гибридизация в промышленном свиноводстве. М., 1987: 271.
6. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность минеральных веществ для животных. Обзорная информация. М., ВНИИТЭИагропром, 1992: 52.
7. Мамонтов Н.Т. и др. Центр гибридизации свиней в Тюменской области. Зоотехния, 1998, 10: 22-25.
8. Методики исследований по свиноводству. Харьков, 1977: 151.
9. Методы биохимического анализа (справочное пособие). Боровск, 1997: 356.
10. Сушков В.С. Научные основы технологии производства свинины. Автореф. дис...д. с.-х. н. Саранск, 1997: 42.

11. Терентьева А.С. Повышение качества свинины в условиях промышленной технологии. Обзорная информация. М., 1980: 49.
12. Терентьева А.С. Использование генофонда свиней в современных условиях производства. Обзорная информация. М., 1988: 44.
13. Шарнин В.Н. Производство свинины на промышленных комплексах. Зоотехния, 1997, 10: 24-27.

НОВЫЕ СПОСОБЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО И БИОХИМИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ СВИНЕЙ ВИТАМИНАМИ

В.И. Дудин, С.Н. Аитов, Т.Е. Рябых, Т.В. Жарова, Е.Е. Комкова
Лаборатории витаминного питания и нейрогуморальной регуляции

Возрастные изменения метаболизма липидов и статуса витаминов позволили выделить для дальнейшего изучения тесты по определению обеспеченности организма свиней витамином В₂ (соотношение концентраций этого витамина в системе эритроциты/ плазма), витамином В₅ (концентрация витамина и продуктов его метаболизма в моче), витамина Е (скорость спонтанного гемолиза эритроцитов и выделение связанного α-токоферилхинона с калом), витамина А (соотношение концентраций ретинола и Т₄ в плазме крови). Разработан простой способ определения количества связанного α-токоферилхинона в кале свиней.

Введение

Учитывая чрезвычайную важность получения продукции от здоровых животных с минимальными затратами средств, большое значение приобретает витаминное питание гибридов. Контроль витаминного питания при производстве свинины является едва ли не самым уязвимым звеном ввиду чрезвычайной сложности методов анализа и широкого спектра нарушений метаболизма, ведущих к уменьшению эффективности производства. Ситуация осложняется еще и тем, что для большинства витаминов существуют клинически слабо проявляющиеся гипо- и гипервитаминозы, часто на фоне практически нормальных уровней этих витаминов в крови. В этой связи, перед нами стояла задача – разработать простые и информативные способы биохимического контроля технологий производства свинины по витаминам. Эти исследования являются неотъемлемой частью разрабатываемой в нашем институте системы питания помесных свиней и предполагают отбор метаболических тестов по их информативности и создание простых методов биохимического анализа.

Материалы и методы

Исследования проведены на двух группах свиней. Группа 1 состояла из 20 свиней крупной белой породы, группа 2 – из 20 помесей маток крупной белой породы с хряками породы дюрок. Опыт проводили с момента рождения животных до конца откорма (208 суток). Кормление осуществляли по технологии промышленных комплексов с использованием комбикормов СК-4 (до 60-дневного возраста), СК-5 (до 105-дневного возраста) и СК-6 (до 208-дневного возраста). Потребление корма учитывали ежедневно, а прирост живой массы по результатам взвешиваний при рождении, в 45-, 60-, 105-, 153- и 208-суточном возрасте. Убой животных осуществляли в возрасте 30, 105 и 208 суток по 3-5 голов из группы.

В отобранных образцах определяли концентрацию общих липидов (1), НЭЖК (2), витаминов В2 (3), В5 (4), А и Е (5); активности липопроотеидлипазы (ЛПЛ, 6), гормончувствительной липазы (ГЧЛ, 7), глюкозо-6-дегидрогеназы (Г6ФД, 8), малатдегидрогеназы (МДГ, 9); интенсивность спонтанного гемолиза эритроцитов (10); содержание связанного α -токоферилхинона (11).

Результаты и обсуждение

Как показали исследования, по хозяйственным показателям по меси, в сравнении с материнской породой (крупная белая), имели ряд преимуществ. По живой массе в 208-суточном возрасте различия составили $102,1 \pm 4,9$ кг против $96,2 \pm 4,3$ кг в контроле, при меньшей ожиренности туши (18,3% против 21,0% в контроле).

В то же время по ряду хозяйственно полезных характеристик по меси не имели преимуществ (выход мяса-58,4% против 59,2%; отношение триптофана к оксипролину $1,78 \pm 0,1$ против $1,96 \pm 0,07$ в контроле). При этом следует указать на более крупные габариты помесных свиней по сравнению с исходной породой. В этой связи можно полагать, что для реализации гетерозиса в отношении мясности туши применяемые в эксперименте стандартные кормосмеси не являются адекватными и требуют доработки, как это было сделано раньше для 3-х породных гибридов.

Отмеченная выше меньшая ожиренность туши у помесей, определенная по выходу жира из жировых депо, находится в определенной связи с концентрацией липидов в органах и тканях (табл. 1).

Таблица 1. Возрастная динамика концентрации липидов в органах и тканях свиней крупной белой породы (а) и их помесей с породой дюрок (б)

Объект изучения	Группы	Возраст, сут		
		30	105	200
Плазма, мг%	а	192,1 ± 8,8	306,1 ± 18,1	189,3 ± 5,9
	б	210,8 ± 7,2	403,3 ± 5,8	221,2 ± 27,8
Печень, г%	а	2,7 ± 0,4	2,0 ± 0,1	3,5 ± 0,2
	б	2,5 ± 0,3	2,6 ± 0,3	3,3 ± 0,6
Дл. мышца спины, г%	а	2,0 ± 0,04	2,4 ± 0,4	2,3 ± 0,5
	б	2,6 ± 0,2	3,1 ± 0,7	2,1 ± 0,3

Отмечен более высокий фон общих липидов в плазме крови помесных свиней независимо от возраста. Это позволяет предположить, что у свиней крупной белой породы по сравнению с помесями имеет место замедленная мобилизация липидов из жировых депо. В возрастном аспекте концентрация липидов в плазме имела всплеск у 105-дневных поросят, что может быть следствием повышенной мобилизации липидов из печени в это время и подтверждается линейной возрастной динамикой в плазме концентрации неэстерифицированных жирных кислот, на что будет обращено внимание ниже (табл. 2). Уровень

Таблица 2. Характеристика обмена липидов у свиней крупной белой породы (а) и их помесей со свиньями породы дюрок (б) в связи с возрастом

Объект изучения	Группы	Возраст, сут		
		30	105	200
Концентрация НЭЖК в плазме, мкг.экв./л	а	215,6 ± 30,7	376,2 ± 4,5	552,0 ± 25,6
	б	285,0 ± 40,9	403,2 ± 25,6	532,0 ± 61,4
Активность ЛПЛ в жир. ткани, мЕ/г	а	–	299,6 ± 30,0	439,7 ± 12,6
	б	–	257,8 ± 23,6	501,3 ± 10,5
Активность ГЧЛ в жир. ткани, мЕ/г	а	–	270,8 ± 30,6	382,6 ± 40,2
	б	–	213,2 ± 21,5	353,6 ± 34,1
Активность Г6Ф-дегидрогеназы в жир. ткани, мЕ/г	а	–	439,3 ± 76,1	274,9 ± 27,7
	б	–	432,6 ± 49,6	339,7 ± 33,4
Активность М-дегидрогиназы в жир. ткани, мЕ/г	а	–	694,9 ± 61,1	857,1 ± 99,9
	б	–	754,0 ± 53,0	910,0 ± 84,3

липидов в печени изменялся с возрастом неоднозначно. Самая контрастная разница была характерна для 105-дневного возраста, также свидетельствующая в пользу некоторого усиления мобилизации печеночных липидов в указанный период жизни у поросят крупной белой породы. В длиннейшей мышце спины концентрация общих липидов у поросят крупной белой породы с возрастом уменьшалась и, практически наоборот, у помесей с дюрком.

Как уже упоминалось выше, в возрастном аспекте отмечалось увеличение концентрации НЭЖК в плазме крови свиней независимо от породной принадлежности. НЭЖК являются одним из основных показателей, характеризующих состояние энергетического обмена в организме животных, вследствие участия в его регуляции. Изученные нами различия в активности НАДФН-генерирующих ферментов наводят на мысль о том, что у помесных поросят существует тенденция к усилению липидных синтезов в жировой ткани. Вместе с тем это не подтверждается увеличением жиросодержания в жировых депо, а отсутствие достоверных различий между группами животных практически по всем показателям позволяет заключить, что помеси крупной белой свиньи с хряками породы дюрком при одинаковых условиях кормления по липидному метаболизму существенно не отличаются от исходной материнской породы.

Одной из основных задач, стоящих перед сельскохозяйственной витаминологией, является поиск путей прижизненного контроля витаминной обеспеченности организма продуктивных животных.

Определение концентрации рибофлавина во фракциях крови показало (табл. 3), что в плазме крови наибольшее отличие существует у свиней крупной белой породы в 105-дневном возрасте. Это отличие состоит в резко повышенном уровне витамина В₂ и его трудно чем-либо объяснить, если исходить из имеющихся в нашем распоряжении сведений. При этом, возрастной особенностью могут являться самые низкие показатели концентрации рибофлавина во фракции эритроцитов у поросят 30-суточного возраста. Практически полностью отсутствуют различия по концентрации рибофлавина в моче у поросят обеих групп.

Одним из показателей тестирования обеспеченности животных рибофлавином может служить соотношение его концентраций в эритроцитах и плазме крови. Это в полной мере подтверждают полученные нами данные. С возрастом, когда потребность в рибофлавине уменьшается, имеет место увеличение отношения концентраций рибофлавина в системе эритроциты/плазма крови.

Таблица 3. Динамика концентрации витаминов В₂ и В₅ в крови и моче свиней крупной белой породы (а) и их помесей со свиньями породы дюрок (б) в связи с возрастом (мкг/мл)

Возраст, сут	Группы	Плазма	Эритроциты	Соотношение эритроциты/плазма	Моча
Витамин В ₂					
30	а	0,15 ± 0,016	0,09 ± 0,014	0,58 ± 0,096	0,18 ± 0,002
	б	0,15 ± 0,015	0,08 ± 0,005	0,54 ± 0,091	0,18 ± 0,002
105	а	0,22 ± 0,003	0,17 ± 0,011	0,77 ± 0,044	0,17 ± 0,002
	б	0,12 ± 0,007	0,014 ± 0,002	1,19 ± 0,055	0,16 ± 0,002
200	а	0,12 ± 0,001	0,18 ± 0,001	1,46 ± 0,018	0,17 ± 0,003
	б	0,12 ± 0,001	0,18 ± 0,003	1,46 ± 0,022	0,17 ± 0,002
Витамин В ₅					
30	а	3,46 ± 0,057	4,65 ± 0,315	1,35 ± 0,106	2,48 ± 0,011
	б	3,63 ± 0,110	4,82 ± 0,227	1,33 ± 0,033	2,55 ± 0,037
105	а	2,20 ± 0,220	3,09 ± 0,253	1,44 ± 0,127	2,82 ± 0,082
	б	2,60 ± 0,409	2,87 ± 0,192	1,25 ± 0,249	2,77 ± 0,102
200	а	2,56 ± 0,020	4,09 ± 0,020	1,60 ± 0,017	3,30 ± 0,081
	б	2,60 ± 0,023	4,12 ± 0,023	1,59 ± 0,021	3,38 ± 0,090

Изменения концентрации ниацина в изученных фракциях крови оказались менее контрастными по сравнению с рибофлавином. Здесь различия между группами животных были неоднозначными и статистически недостоверными. Отсутствовали также возрастные и межгрупповые различия в соотношении концентраций ниацина в системе эритроциты/плазма крови. В аспекте поиска способов тестирования обеспеченности организма животных весьма перспективным может оказаться измерение концентрации ниацина в моче, которая хорошо реагирует на возрастные изменения в потребности в этом витамине у свиней.

Прижизненное тестирование обеспеченности витамином А представляет наибольшие трудности ввиду его жесткого гомеостатирования в крови и отсутствия легко определяемых продуктов его деградации в экскрементах. Основной идеей в этом плане является поиск взаимосвязей между концентрациями ретинола и тиреоидных гормонов в крови, но для этого нужен специальный эксперимент. Как видно из полученных нами результатов (табл. 4), уровень ретинола в печени был достаточным во все возрастные периоды без статистически значимых различий между группами свиней.

Концентрация витамина Е в плазме свиней в возрастном аспекте претерпевала повышение от 30 до 105-суточного возраста с возвращением к исходному уровню в 200-суточном. Исходя из того, что подобные изменения испытывала также концентрация витамина Е в пече-

ни, плазма крови может отражать обеспеченность организма свиней витамином Е в большей степени, чем обеспеченность витамином А. При этом также не обнаружено существенных различий в статусе витамина Е между группами свиней. В проведенном нами эксперименте с супердозированием витамина Е свиньям породы дюрок (250 мг/кг корма) было установлено, что эритроциты не отвечают на повышение уровня витамина Е в рационе. В то же время для тестирования обеспеченности свиней витамином Е может служить измерение скорости гемолиза эритроцитов, однако лучше всего подходит метод определения связанного α -токоферилхинона в кале. Ограничением может служить лишь применение в тесте сложных в постановке анализов.

Таблица 4. Динамика концентрации витаминов А и Е в плазме и печени свиней крупной белой породы (а) и их помесей со свиньями породы дюрок (б) в связи с возрастом

Возраст, сут	Группы	Плазма, мкг/мл	Печень	
			мкг/г	мг/орган
Витамин А				
30	а	0,44 ± 0,011	47,68 ± 2,05	7,07 ± 0,52
	б	0,44 ± 0,033	49,04 ± 3,31	8,26 ± 0,56
105	а	0,49 ± 0,012	104,60 ± 13,06	78,84 ± 11,07
	б	0,49 ± 0,024	116,13 ± 4,08	93,72 ± 9,15
200	а	0,47 ± 0,027	146,15 ± 3,31	218,90 ± 5,32
	б	0,46 ± 0,021	143,88 ± 7,61	183,26 ± 24,26
Витамин Е				
30	а	2,96 ± 0,410	3,19 ± 0,16	0,47 ± 0,04
	б	2,72 ± 0,250	3,34 ± 0,11	0,56 ± 0,02
105	а	4,82 ± 0,084	11,50 ± 0,62	8,65 ± 0,99
	б	5,04 ± 0,170	10,38 ± 0,54	8,984 ± 0,44
200	а	2,56 ± 0,082	5,78 ± 0,26	8,66 ± 0,58
	б	2,48 ± 0,081	5,90 ± 0,21	7,44 ± 0,38

В целом, проведенные исследования показали, что при одинаковом стандартном кормлении свиньи крупной белой породы по обмену липидов и витаминов не имеют существенных отличий от свиней, полученных скрещиванием маток крупной белой породы с хряками породы дюрок. Для прижизненного контроля витаминной обеспеченности в рамках технологического мониторинга при производстве свинины отобраны для дальнейшей детальной проработки тесты, простые в постановке и информативные по сути.

Биохимический контроль обеспеченности витамином В₂ предполагает разделение крови свиней на плазму и эритроциты. После опре-

деления концентрации в них рибофлавина, рассчитывают соотношение концентраций эритроциты/плазма. В текущем году способ контроля был выявлен в связи с возрастом и породностью животных (рис. 1).

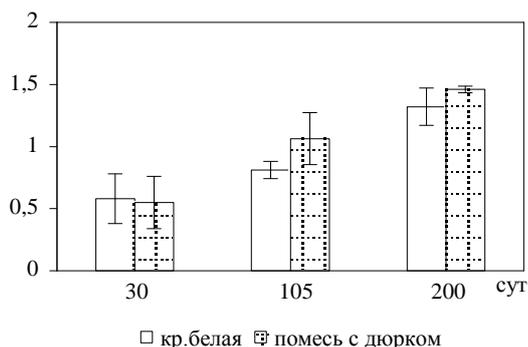


Рис. 1. Соотношение концентраций рибофлавина эритроциты/плазма крови в связи с возрастом и породностью свиней.

Дальнейшие работы необходимо вести по пути установления количественных взаимоотношений между тестируемым показателем и функциональной обеспеченностью потребности организма в рибофлавине.

Биохимический контроль обеспеченности витамином B₅ при жизни рекомендуем вести по его концентрации в моче. Такая рекомендация вытекает из исследований отчетного года по изучению возрастных особенностей по концентрации ниацина у свиней крупной белой породы и их помесей с дюрком (рис. 2).

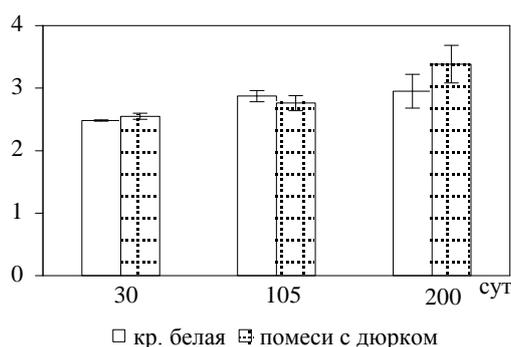
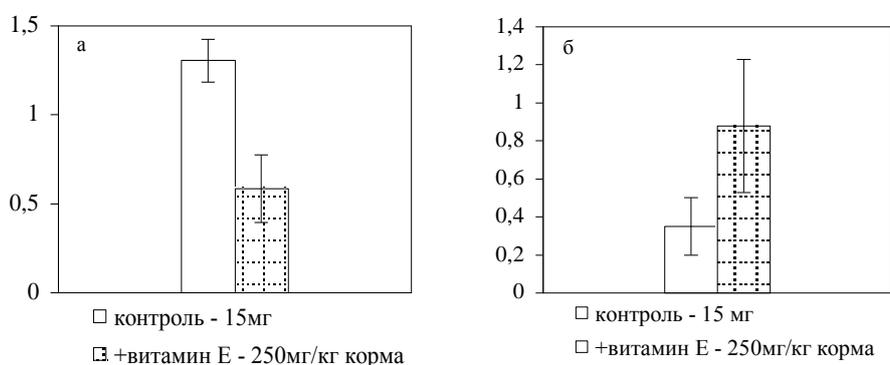


Рис. 2. Концентрация ниацина в моче в связи с возрастом и породностью свиней.

Дальнейшие работы по апробации способа тестирования связаны с поиском простого метода определения в моче свиней конечных продуктов обмена ниацина (N-метилникотинамид).

Биохимический контроль обеспеченности витамином E можно вести по определению спонтанного гемолиза эритроцитов (рис. 3а).

Этот тест прост в постановке и интерпретации, но судя по литературе не является высокоспецифичным. Другой тест, основанный на определении связанного α -токоферилхинона в кале, является высокоспецифичным (рис. 3б), но сложным в постановке. В этой связи в текущем году была предпринята довольно успешная попытка создания простого в постановке способа тестирования метаболизма витамина Е по экскреции с калом конечного продукта метаболизма витамина Е – свя-



занного α -токоферилхинона.

Рис. 3. Спонтанный гемолиз эритроцитов (а,%) и выделение конъюгатов α -токоферилхинона с калом (б, мкг/г) у 105 - суточных свиней в связи с обеспеченностью рациона витамином Е

Способ состоит в экстракции липидов кала (2), для чего отбирают пробу кала массой около 2 г, помещают ее в колбочку на 100 мл, приливают 50 мл хлороформ-метаноловой смеси, с помощью стеклянной палочки хорошо перемешивают содержимое и оставляют в ночь при комнатной температуре. Утром смесь фильтруют, к фильтрату приливают 50 мл воды, встряхивают и оставляют до расслоения. Водный слой отбирают, упаривают до объема 40 мл, приливают 60 мл концентрированной соляной кислоты, нагревают при 80° С в течение 2-х часов и после охлаждения экстрагируют в делительной воронке гексаном (2 x 25 мл). Гексановый экстракт отмывают водой, упаривают, растворяют в 3 мл гексана и измеряют поглощение УФ-света при 276 нм против гексана. Затем перерастворяют экстракт в 3 мл этанола и измеряют поглощение при 276 нм против этанола. Разность поглощения при 276 нм между этанолом и гексаном используют для определения концентрации связанного α -токоферилхинона в кале ($E\ 1\%, 1\text{ см} = 140$).

Биохимический контроль обеспеченности витамином А при жизни свиней вполне можно вести путем измерения количеств витамина А и тироксина в плазме крови (рис. 4).

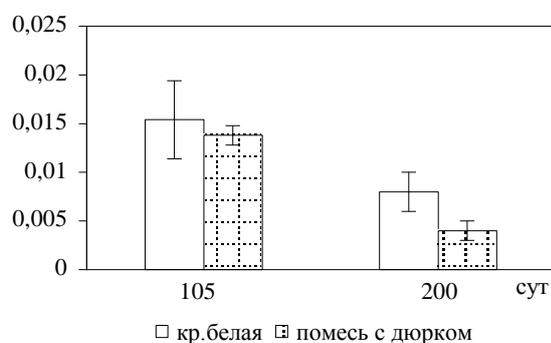


Рис. 4. Соотношение концентраций витамина А и тироксина в связи с возрастом и породностью поросят.

Приведенные выше материалы по отбору тестов подтверждаются данными корреляционного анализа (табл. 5). Тестирование обеспеченности организма поросят рибофлавином может осуществляться путем определения его концентрации в эритроцитах, однако наиболее тесно с показателями продуктивности свиней связано соотношение витамина в системе эритроциты/плазма. Что касается ниацина, то здесь однозначно,

Таблица 5. Взаимосвязь предполагаемых тестовых характеристик прижизненной оценки витаминной обеспеченности организма свиней с показателями их продуктивности (r)

Тестируемая характерист.	Показатели продуктивности			
	живая масса	масса мышц	масса жира	масса костей
Рибофлавин				
Плазма	-0,35	-0,35	-0,38	-0,34
Эритроциты	+0,74	+0,74	+0,59	+0,72
Эритр./плазма	+0,87	+0,87	+0,77	+0,85
Моча	-0,46	-0,46	-0,32	-0,41
Ниацин				
Плазма	-0,37	-0,37	-0,22	-0,36
Эритроциты	-0,06	-0,06	+0,10	-0,06
Эритр./плазма	+0,33	+0,33	+0,30	+0,30
Моча	+0,87	+0,88	+0,75	+0,89
Витамин А				
Плазма	+0,13	+0,11	-0,02	+0,12
Тироксин				
Плазма	+0,67	+0,65	+0,56	+0,66
Витамин А/Тироксин				
Плазма	-0,75	-0,73	-0,69	-0,72
Витамин Е				
Плазма	-0,33	-0,33	-0,47	-0,33
НЭЖК				
Плазма	+0,80	+0,80	+0,72	+0,78

что тестирование обеспеченности организма свиней витамином В₅ следует вести по его экскреции с мочой. Из липидных показателей с продуктивностью тесно связана только концентрация в плазме неэстерифицированных жирных кислот.

Заключение

В опыте на свиньях крупной белой породы и помесях от маток крупной белой породы с хряками породы дюрок с момента рождения до 208-суточного возраста исследовали обмен липидов и статус витаминов А, Е, В₂ и В₅ с целью отбора информативных биохимических характеристик для прижизненного тестирования обеспеченности животных этими витаминами в процессе производства свинины. В результате исследований не было обнаружено статистически достоверных различий между группами животных по обмену липидов (концентрация общих липидов, НЭЖК, активность ГЧЛ, ЛПЛ, ГбФДГ, МДГ). Из всех исследованных характеристик липидного метаболизма, в качестве тестовой может быть использована концентрация в плазме НЭЖК. Витаминный статус свиней обеих групп также различался не существенно, за исключением концентрации в крови рибофлавина у 105-суточных свиней, которая выше была у представителей крупной белой породы. Проведенные исследования позволили отобрать для прижизненного тестирования обеспеченности свиней витаминами в процессе производства свинины следующие характеристики: витамином В₂ – путем измерения соотношения его концентраций в системе эритроциты/плазма крови; витамином В₅ – путем определения его концентрации в моче; витамином А – на основе измерения соотношения в плазме крови свиней концентраций витамина А к тироксину; витамином Е – путем измерения выделения с калом связанного α -токоферилхинона, которое с большой точностью можно осуществить на основе измерения его разностного спектра между этанолом и гексаном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folch L.M., Lees M., Sloan-Stainly. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226: 497-509.
2. Duncombo W.G. The colorimetric microdetermination of long fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1963, 88: 7-10.
3. Поволоцкая К.Л., Зайцева Н.И., Скоробогатова Е.П. Флуорометрический метод определения рибофлавина. *Витаминные ресурсы и их использование*. М., 1955, 3:108-120.
4. Степанова Е.Н. О колориметрическом методе определения никотиновой кислоты в пищевых продуктах и биологических объектах. *Вопросы питания*, 1963, 4: 66-70.

5. Скурихин В.Н., Двинская Л.М. Определение α -токоферола и ретинола в плазме крови сельскохозяйственных животных методом микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Сельск. биология, 1989, 4: 127-129.
6. Borron D.C., Jensen L.S., McCartney M.G. Comparison of lipoprotein lipase activity in chickens and turkeys. Poultry Sci., 1979, 58: 659-662.
7. Vaughan M.J., J.E. Berger, D. Steinberg. Hormone sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. J. Biol. Chem., 1964, 239, 2: 401-409.
8. Clock G.E. Further Studies on the properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem. J., 1953, 55: 400-408.
9. Ochoa S. Malic enzyme. Methods in Ensimology. Ed. Colowick S.P., Kaplan N.O., 1955, 1: 739-741.
10. Двинская Л.М., Решетова Л.В., Дудин В.И. Определение стойкости эритроцитов к гемолизу при действии диалуровой кислоты (гемолитический тест). Жирорастворимые витамины и методы их определения в биологических субстратах, 1979: 84-87.
11. Chow C.K., Draper H.H., Csallany A.S., Chin M. The metabolism of ^{14}C -alpha-tocopherylquinone and ^{14}C -alpha-tocopherylhydroquinone. Lipids, 1967, 23: 390-396.

ОСОБЕННОСТИ АЗОТИСТОГО МЕТАБОЛИЗМА И ФОРМИРОВАНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У СВИНЕЙ РАЗНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРОДУКТИВНОСТИ

М.Д. Аитова, К.Т. Еримбетов, Е.И. Кузнецова
Лаборатория белково-аминокислотного питания

Под опытом находились свиньи крупной белой породы и двухпородные помеси (крупная белая х дюрок) в период с 30- до 208-сут возраста. Исследования показали, что помесные свиньи по сравнению с исходной материнской породой (крупная белая) эффективнее используют азотистые вещества корма и отличаются более высокими показателями роста и накопления мышечной ткани, особенно во вторую фазу доращивания (с 61- по 105-сут возраст) и в первый период откорма (105 – 153-сут возраст). В ходе опыта выявлена высокая корреляция между показателями мясной продуктивности (живая масса, выход мяса) и концентрацией саркоплазматических ($r = +0,99$, $r = +0,93$) и стромальных ($r = +0,79$ и $r = +0,80$, соответственно) белков в длиннейшей мышце спины, а также между указанными показателями, концентрацией креатинина ($r = +0,80$ и $r = +0,81$) и активностью щелочной фосфатазы в плазме крови ($r = -0,78$ и $r = -0,77$, соответственно).

Введение

Жировая ткань у свиней особенно интенсивно развивается в период раннего постнатального роста (4). Интенсивное накопление жировой ткани в раннем возрасте, как показывают исследования (5, 7), сопровождается снижением белкового синтеза и торможением роста животных. Механизмы, ответственные за быстрое накопление липидов в теле по мере созревания животного, окончательно не выяснены, но известно, что важная роль в этих процессах принадлежит кормовым факторам. Возникает вопрос, в какой период постнатального развития и какими факторами наиболее целесообразно воздействовать на метаболизм с целью управления ростом и качеством мяса.

В задачу настоящих исследований входило изучение состояния азотистого обмена, интенсивности роста, накопления мышечной ткани у свиней разного потенциала продуктивности с целью выявления метаболических звеньев, контролирующих формирование мышечной ткани, и установления тестов раннего прогнозирования мясных качеств свиней.

Материалы и методы

Опыт проведен в виварии института на поросятах крупной белой породы и двухпородных помесях (крупная белая х дюрок) в период с 30- по 208-сут возраст. Содержание и кормление животных групповое (по 10 голов в станке) по нормам и рационам, принятым на предприятиях промышленного типа. В частности, комбикорма по уровню обменной энергии, протеину и биологически активным веществам соответствовали рецептуре СК-4 для поросят 45-60-сут возраста, СК-5 – 61-105-сут возраста, СК-6 – с 106 по 208-сут возраст (окончание откорма). Отъем поросят произведен в 45-сут возрасте, когда и были сформированы две группы поросят по 20 голов.

Убой животных проводили в 30, 105 и 208-сут возрасте по 3-5 голов из группы. Проведена обвалка туш и для анализа взята кровь, длиннейшая мышца спины, а в 208-сут возрасте – гомогенат общих мышц.

В плазме крови определяли: активность ферментов переаминирования – аланин- и аспаратаминотрансфераз (АЛТ и АСТ)(8), концентрацию мочевины (3), концентрацию креатинина по реакции Яффе в щелочном пикрате (2); в сыворотке крови – активность щелочной фосфатазы (1); в длиннейшей мышце спины – концентрацию общего белка по Кьельдалю, фракционный состав мышечных белков (саркоплазматические, миофибриллярные и белки стромы) методом высаливания (6).

Результаты и обсуждение

Как показали исследования, помесные свиньи существенно отличались от материнской породы (крупная белая) по интенсивности роста и, соответственно, по характеру метаболических процессов. В 30-сут возрасте, когда поросята находились под маткой, помесные свиньи уступали своим сверстникам крупной белой породы по живой массе ($6,38 \pm 0,2$ против $6,98 \pm 0,3$ кг), а показатели азотистого обмена у них указывали на менее эффективное использование азотистых веществ корма в биосинтетических процессах (табл. 1). В частности, активность аланинаминотрансферазы и концентрация мочевины – конечного продукта азотистого обмена в плазме крови были выше у помесных свиней ($41,62 \pm 2,50$ и $4672,9 \pm 716,8$ против $32,36 \pm 7,16$ мкг пирувата Na/мл и $3507,6 \pm 518,8$ мкмоль/л мочевины, соответственно), тогда как концентрация креатинина (метаболита, характеризующего массу скелетных мышц) и концентрация белка в скелетных мышцах были выше у поросят крупной белой породы ($62,72 \pm 7,17$ и $20,29 \pm 0,16$ против $46,86 \pm 3,30$ мкмоль/л и $19,86 \pm 0,6$ г%, соответственно).

Таблица 1. Живая масса и показатели азотистого обмена у поросят 30-сут возраста

Показатели	Крупная белая	Крупная белая х дюрок
Живая масса, кг	$6,98 \pm 0,3$	$6,38 \pm 0,3$
Аминотрансферазы, мкг пирувата Na/мл:		
АСТ	$89,60 \pm 14,10$	$65,00 \pm 3,58$
АЛТ	$32,40 \pm 7,16$	$41,60 \pm 2,50$
Мочевина, мкмоль/л	3507 ± 518	4873 ± 716
Креатинин, мкмоль/л	$62,80 \pm 7,8$	$46,90 \pm 3,3$
Щелочная фосфатаза, мг кат/л	$1,29 \pm 0,03$	$1,48 \pm 0,13$
Общий белок длинн. мышцы спины, г%	$20,30 \pm 0,51$	$19,90 \pm 0,68$
в т.ч. саркоплазматические	$7,47 \pm 0,13$	$7,61 \pm 0,30$
миофибриллярные	$10,50 \pm 0,17$	$10,26 \pm 0,35$
стромальные	$1,93 \pm 0,13$	$1,42 \pm 0,12^*$

Примечание: * – здесь и далее $P < 0,02$ или $P < 0,05$

Помесные свиньи существенно отставали от поросят крупной белой по интенсивности роста и в первые 15 дней послеотъемного периода имели среднесуточный прирост живой массы $46,0 \pm 8,5$ г против $112,1 \pm 11$ г у поросят крупной белой породы (табл. 2), что вероятно связано с более низкой устойчивостью помесных поросят к стрессовым факторам (ранний отъем и перевод на кормление комбикормом). В дальнейшем помесные свиньи по показателям роста существенно опережали свиней материнской породы и к концу откорма (208-сут возраст)

та) разница в живой массе составила 6 кг в пользу помесей (102,1±4,9 против 96,2±4,3 кг)(табл. 2). Так, в период с 61- по 105-сут возраст среднесуточный прирост живой массы у помесей был уже на 30 г, а в первую фазу откорма (106-153 сут) – на 55 г выше, чем у свиной крупной белой породы (477±18 и 614±47 г против 447±23 и 559±29 г, соответственно).

Таблица 2. Показатели продуктивности свиной разного возраста и генотипа

Возраст, сут	Живая масса, кг		Среднесут. прирост, г	
	кр. белая	кр. бел х дюрк	кр. белая	кр. бел х дюрк
45	8,40±0,28	8,86±0,35	–	–
60	10,09±0,29	9,55±0,40	112±11	46±8,5*
105	30,22±1,02	31,05±1,10	447±23	477±18*
153	55,62±2,11	60,50±2,10*	559±29	614±47
208	96,20±4,34	102,13±4,96	738±35	757±42

Биохимические исследования показали, что в периоды более интенсивного роста помесные поросята эффективнее использовали азотистые вещества в биосинтетических процессах. Как видно из табл. 3, в

Таблица 3. Показатели азотистого обмена у свиной 105- и 208-сут возраста

Показатели	Крупная белая		Крупная белая х дюрк	
	105 сут	208 сут	105 сут	208 сут
<i>Аминотранс-феразы, мкг пирувата</i>				
<i>Na/мл:</i>				
АСТ	26,60±2,11	35,00±4,16	15,90±1,08*	57,80±1,56*
АЛТ	13,20±1,05	30,40±2,35	9,00±0,34*	34,70±2,11
Мочевина, мкмоль/л	2984±200	6027±611	2564±673	5439±607
Креатинин, мкмоль/л	39,00±5,07	82,20±9,45	44,50±6,30	95,40±5,83
Щелочная фосфатаза, мк кат/л	1,32±0,17	1,04±0,5	1,23±0,05	1,23±0,09

105-сут возрасте в плазме крови помесных свиной активность ферментов переаминирования, ответственных за катаболизм аминокислот в тканях, была достоверно ниже, чем у поросят крупной белой породы (9,0±0,34 и 15,9±1,08 против 13,2±1,05 и 25,6±2,11 мкг пирувата Na/мл, соответственно АЛТ и АСТ). Существенно ниже у этих поросят была и концентрация мочевины (2564±673 против 2984±200 мкмоль/л). Концентрация креатинина, напротив, была ниже у свиной крупной белой

породы ($39,0 \pm 5,07$ против $44,5 \pm 6,30$ мкмоль/л). О лучшем использовании помесными свиньями азотистых веществ в тканевом метаболизме говорят и данные контрольного убоя животных. Выход мышечного мяса и концентрация белка в нем были значительно выше у помесных свиной (табл. 4).

Таблица 4. Результаты контрольного убоя подопытных свиной

Показатели	Крупная белая		Крупная белая х дюрок	
	105 сут	208 сут	105 сут	208 сут
Живая масса, кг	$34,48 \pm 2,34$	$97,5 \pm 6,83$	$37,86 \pm 4,67$	$103,90 \pm 10,40$
Масса полутуши, кг	$9,16 \pm 0,69$	$28,46 \pm 2,58$	$9,86 \pm 1,36$	$31,68 \pm 3,81$
Выход мяса, кг	$5,86 \pm 0,38$	$16,84 \pm 1,29$	$6,41 \pm 0,74$	$17,59 \pm 2,14$
Выход костей, кг	$2,29 \pm 0,28$	$5,65 \pm 0,75$	$2,33 \pm 0,17$	$6,91 \pm 0,81$
Выход жира, кг	$1,01 \pm 0,17$	$5,97 \pm 1,16$	$1,12 \pm 0,32$	$7,18 \pm 1,08$
Концентрация белка в мясе, %	$15,56 \pm 1,24$		$18,14 \pm 0,98^*$	

К концу откорма (возраст 208 сут) картина несколько изменилась. Хотя помесные свиньи к этому времени несколько опережали свиной крупной белой по показателям роста – среднесуточный прирост за период 154-208 сут составил соответственно 757 ± 42 и 738 ± 36 г (табл. 2) и имели более высокий выход мяса ($17,89 \pm 2,14$ против $16,83 \pm 1,29$ г) (табл. 4), тем не менее биохимические исследования указывают на появившуюся у них тенденцию к снижению эффективности использования азотистых веществ в тканевом метаболизме. Активность ферментов переаминирования в плазме крови помесных свиной, убитых в 208-сут возрасте, была уже несколько выше, чем у крупной белой ($57,80 \pm 1,56$ и $34,67 \pm 2,11$ против $35,03 \pm 4,16$ и $30,37 \pm 2,35$ мкг пирувата Na/мл, соответственно АСТ и АЛТ) (табл. 3). У животных этой группы к концу откорма ухудшился фракционный состав мышечных белков ($9,11 \pm 0,44$ миофибриллярных и $4,32 \pm 0,21$ стромальных против $10,43 \pm 0,23$ и $2,40 \pm 0,61$ г%, соответственно). В 105-сут возрасте этот показатель был одинаковым у свиной обеих групп (табл. 5). Надо полагать, что у помесных свиной в силу более интенсивного роста раньше

Таблица 5. Фракционный состав длинной мышцы спины у свиной, г%

Показатели	Крупная белая		Крупная белая х дюрок	
	105 сут	208 сут	105 сут	208 сут
Саркоплазматические	$7,93 \pm 0,27$	$9,37 \pm 0,24$	$8,30 \pm 0,17$	$9,67 \pm 0,11$
Миофибриллярные	$9,61 \pm 0,44$	$10,43 \pm 0,23$	$9,96 \pm 0,25$	$9,11 \pm 0,24^*$
Белки стромы	$2,54 \pm 0,19$	$2,40 \pm 0,61$	$2,57 \pm 0,23$	$4,32 \pm 0,21^*$
Общий белок	$20,08 \pm 0,63$	$22,20 \pm 0,21$	$20,83 \pm 0,85$	$23,10 \pm 0,16^*$

наступает фаза зрелости, усиливается синтез белков стромы в мышечной ткани и снижается эффективность использования аминокислот в биосинтетических процессах (у помесей возраст достижения 100 кг массы тела был на 12 сут меньше, чем у свиней крупной белой). Не исключено, что используемый в этом возрастном периоде комбикорм был недостаточен по энергии (уровень обменной энергии 12,6 МДж) для интенсивно растущих помесных свиней.

Одной из важных задач является поиск путей раннего прогнозирования мясных качеств свиней. Обработка данных, полученных за весь период опыта, позволила выявить ряд корреляций между отдельными биохимическими показателями и мясной продуктивностью свиней (табл. 6). Высокий коэффициент корреляции был выявлен между живой массой, выходом мяса и концентрацией саркоплазматических белков в длиннейшей мышце спины ($r = +0,99$ и $r = +0,93$), несколько менее выраженный – между указанными хозяйственными показателями и уровнем белков стромы ($r = +0,79$ и $r = +0,80$, соответственно). Вместе с тем, уровень стромальных белков оказался в высокой положительной корреляции с содержанием белка в длиннейшей мышце спины ($r = +0,90$). Проявилась положительная корреляция между выходом мяса и концентрацией креатинина в крови. Неожиданным, на наш взгляд, оказалось обнаружение корреляции между выходом мяса и активностью щелочной фосфатазы в крови, хотя она и носит отрицательный характер ($r = -0,77$). Если связь составных компонентов мышечной ткани (стромальных и саркоплазматических белков) с выходом мяса легко объяснить, как и связь с креатинином (метаболитом энергетического обмена в мышцах), то с активностью щелочной фосфатазы, выполняющей функции больше связанные с метаболизмом в костной ткани, объяснение найти трудно еще и потому, что нам не удалось выявить корреляцию между активностью указанного фермента и выходом костей в туше.

Таблица 6. Коэффициенты корреляции биохимических показателей с откормочными и мясными качествами свиней

Показатели	Саркоплазматические белки	Белки стромы	Щелочная фосфатаза	Креатинин
Живая масса	+0,99	+0,79	-0,78	+0,80
Выход мяса	+0,93	+0,80	-0,77	+0,81
Содержание белка в длинн. мышце спины	+0,85	+0,90	-0,63	
Выход мяса		30-сут возраст +0,84*	-0,81*	

Ввиду того, что прогнозировать мясную продуктивность необходимо в раннем возрасте, нами отдельно были обработаны данные по животным 30-сут возраста. Несмотря на малое поголовье (убито всего 6 голов), выявлена высокая положительная корреляция между живой массой, выходом мяса и концентрацией белков стромы в длиннейшей мышце спины и отрицательная – с выходом мяса и активностью щелочной фосфатазы в крови (табл. 6).

Заключение

Проведенные исследования показали, что помесные свиньи (крупная белая х дюрок) отличаются от исходной материнской породы интенсивностью роста и накопления мышечной ткани. Реализация гетерозиса в условиях эксперимента наиболее проявилась в период доращивания (61-105-сут возраст) и в первую фазу откорма (106-153 сут). Разница по среднесуточному приросту живой массы в указанные периоды составила 7 и 10% соответственно в пользу помесных свиней. У помесных животных был более высоким выход мышечного мяса и концентрация белка в скелетных мышцах. И, как показали биохимические исследования (активность ферментов переаминирования, концентрация мочевины и креатинина), помесные свиньи в период интенсивного роста эффективнее использовали азотистые вещества корма в биосинтетических процессах. Вместе с тем, в ходе эксперимента выявлены узкие места в технологии выращивания и откорма двухпородных свиней. В частности, помесные поросята отставали от поросят крупной белой породы в период подсоса и особенно в первые 15 дней после отъема. Это указывает на необходимость поиска путей оптимизации технологии отъема и выращивания двухпородных поросят под маткой. Не полностью реализован потенциал продуктивности помесных свиней и в период откорма. Требуется исследование по выяснению причин снижения темпа прироста живой массы в период с 154- по 208-сут возраст (свиньи крупной белой повысили прирост в этот период по сравнению с предыдущим на 32%, помесные – всего на 23%). Исходя из анализа полученных данных, такие биохимические показатели как активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови и концентрация стромальных белков в длиннейшей мышце спины, могут быть предложены в качестве тестов раннего прогнозирования мясной продуктивности у свиней. Высокой степени достоверности указанные корреляции получены как на всем поголовье за весь период опыта, так и в раннем 30-сут возрасте. Важно отметить, что в будущем желательно такие исследования начинать в более раннем возрасте и на большем поголовье, а пробы крови и мышц брать не убивая животных, что позволит проследить весь хозяйственный цикл на одних и тех же животных.

Что касается выявления метаболических звеньев, контролирующих формирование компонентов мяса, то обнаруженная высокая корреляция между концентрацией саркоплазматических белков в скелетных мышцах и выходом мышечного мяса, вероятно, может рассматриваться в качестве показателя, который характеризует в каждый текущий период роста интенсивность биосинтетических процессов в мышечной ткани. Исследования в этом направлении продолжаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов С.Г. Методы анализа минеральных элементов, их соединений и активности металлосодержащих ферментов. Методы биохимического анализа (справочное пособие), Боровск, 1997: 150.
2. Лемперт М.Д. Биохимические методы исследования. Кишинев, 1968: 18-20.
3. Coulambe S.S., Fawrean S. New the semimicro method determination of urea. Clin. Chem., 1963, 9: 23.
4. Henry V. lobesite chez le porc: comment la maitriser. Economic et Medicine Animals, 1975, 16, 5-6: 261-283.
5. Hood R.Z. Adipose tissue cellularity and lipogenic activity in porcine and bovine animals. Ph. D. Thesis. University of Minnesota, St. Paul, 1972: 298.
6. Helander E. On quantitative muscle protein determination sarcoplasm and myofibrile protein content of normal and atrophy skeletal muscle. Acta Physiologica Scand., 1957, 41: 141.
7. Lee V.B., Kauffman R.G., Grummer R.H. Effect of early nutrition on the development of adipose tissue in the pig. II. Weight constant basis. J. Anim. Sci., 1973, 37, 6: 1312-1318.
8. Reitman S., Frankel S. A calorimetric method for the determinations glutaminoxalacetic and glutaminoxalacetic transaminases. Am. J. Clin. Path., 1957., 1: 28.

МИНЕРАЛЬНЫЙ СТАТУС И ФОРМИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ У МОЛОДНЯКА СВИНЕЙ РАЗНОГО ГЕНОТИПА

*С.Г. Кузнецов, В.Д. Омельченко, В.И. Калашник
Лаборатория минерального питания*

Изучены особенности роста и развития молодняка свиней крупной белой породы и помесных животных (крупная белая х дюрок) в возрасте 30-208 суток, определена динамика содержания минеральных элементов в крови, костной и мышечной ткани, печени, почках, стенке кишечника. Предлагаются критерии раннего (в возрасте 30-105 суток) прогнозирования мясных и откормочных качеств свиней.

Введение

В качестве биохимических тестов раннего прогнозирования мясных качеств свиней используют показатели углеводного обмена, активности некоторых ферментов (например, аминотрансфераз, креатинфосфокиназы плазмы крови), гормонального статуса, иммунной системы и др. (1-3, 5, 8). Однако практическое использование этих исследований в значительной степени тормозится отсутствием достаточной информации о роли отдельных биохимических показателей и их комбинаций в формировании и реализации продуктивного потенциала животных.

В связи с вышеуказанным перед нами была поставлена задача установить закономерности формирования костной ткани и распределения минеральных веществ в организме молодняка свиней для уточнения и дополнения критериев раннего прогнозирования мясных и откормочных качеств.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи был проведен в виварии института комплексный опыт на свиньях крупной белой породы и их помесях с дюрками в периоды доращивания и откорма. Поросят отняли от маток в возрасте 45 суток и затем сформировали по принципу парных аналогов две группы: животные крупной белой породы – 15 голов (9 свинок и 6 боровков) и помесные животные – 20 голов (11 свинок и 9 боровков). Содержание поросят групповое, поение из автопоилок. Кормили животных обеих групп одинаково. Убой животных проводили в возрасте 30 суток (подсосные поросята, по 3 головы из группы), 107 суток (по 5 голов), 208 суток (по 3 головы). Опыт продолжался 163 дня. В органах и тканях животных определяли содержание минеральных элементов, делали промеры бедренной кости и далее рассчитывали индексы ее макроморфометрии, изучали механические параметры пястных костей. В крови определяли активность церулоплазмينا, гемоглобин и гематокрит (6, 7).

Результаты и обсуждение

В первый месяц опыта рацион животных был недостаточно сбалансирован по основным питательным веществам и энергии и в этих условиях кормления интенсивность роста помесных поросят в возрасте 45-60 суток была в 2,5 раза ниже по сравнению с чистопородными животными. Далее рационы соответствовали существующим нормам и темпы роста помесных свиней были постоянно выше, чем у животных крупной белой породы (на 2,6-9,8%). Потребление корма животными

обеих групп было одинаковым (309 кг на 1 голову за опыт или 1,9 кг/сут). Эффективность использования корма в первые две недели опыта у помесных поросят оказалась в 2,5 раза ниже, далее она была у них стабильно выше (на 2,6-13,6%) по сравнению с животными крупной белой породы. В целом за опыт прирост живой массы у помесного молодняка был выше на 33 г/сут или на 6,1% ($P < 0,05$), эффективность использования корма – на 5,7%, при одинаковом потреблении корма. Живая масса в конце опыта у помесей оказалась выше на 6 кг, а возраст достижения массы тела 100 кг – на 12 суток меньше по сравнению с чистопородными животными.

Достоверных различий по результатам контрольного убоя подопытных животных мы не обнаружили, хотя тенденции прослеживались довольно четко. У чистопородных поросят в возрасте 30 и 107 суток был существенно выше убойный выход и выход костей, а у помесных животных в это время был больше выход мяса. В конце откорма картина изменилась. Помесные животные уже превосходили чистопородных по убойному выходу на 2% и выходу костей на 3,5%, а чистопородные превосходили помесных по выходу жира на 2,7% и выходу мяса на 0,8%. В месячном возрасте помесные животные имели лучшее развитие внутренних органов (по их абсолютной и относительной массе), а в месячном возрасте эта закономерность сменилась на противоположную. В конце откорма помесные животные значительно уступали чистопородным по массе печени, легких, сердцу, но несколько превосходили их по развитию селезенки и почек.

Интенсивность гемопоэза у помесных поросят 30-сут возраста была достоверно ниже, чем у сверстников материнской породы и эта закономерность сохранялась до 3,5 месяцев. В конце опыта показатели гемоглобина и гематокрита у помесей оказались выше соответственно на 12 и 11% ($P < 0,05$), что тесно коррелировало с интенсивностью роста и адаптацией животных к условиям кормления. Активность церулоплазмينا в плазме крови помесных свиней была во все периоды опыта выше, особенно в возрасте 1 и 7 месяцев, по сравнению с чистопородными животными (табл. 1). Этот показатель вполне годится в качестве биохимического теста раннего прогнозирования откормочных качеств свиней. Церулоплазмин играет важную роль в обмене меди и железа, синтезе цитохромов, гемоглобина и миоглобина, в защитных реакциях организма (4).

Абсолютные промеры и индексы макроморфометрии бедренной кости у 1- и 3,5-мес поросят обеих групп не имели существенных отличий. Однако в конце опыта разница по некоторым показателям оказалась достоверной. Так, бедренная кость помесных животных отличалась большей абсолютной и относительной массой, массивностью, шириной проксимального эпифиза, периметром и шириной диафиза, меньшей расширенностью эпифизов (табл. 2, 3).

Таблица 1. Величина гематокрита, содержание гемоглобина в цельной крови и активность церулоплазмينا в плазме крови свиной разного возраста и генотипа

Показатели	30 сут		107 сут		208 сут	
	крупная белая	кр.белая х дюррок	крупная белая	кр.белая х дюррок	крупная белая	кр.белая х дюррок
Гемоглобин, г/л	145,8±3,8	128,1±1,4*	140,8±4,3	129,4±1,5*	138,2±1,6	154,2±2,8*
Гематокрит, %	41,9±0,7	37,7±0,9*	44,0±1,4	39,0±0,8*	43,1±0,6	47,8±0,4*
Церулоплазмин, мкМ						
пфд/ч/мл	24,5±1,8	33,0±3,2*	25,2±2,0	26,0±1,8	75,0±7,1	100,5±13,5*

Примечание: * – здесь и далее разница между группами статистически достоверна

Таблица 2. Абсолютные промеры бедренной кости свиной крупной белой породы и их помесей с дюрками в связи с возрастом

Показатели, см	30 сут		107 сут		208 сут	
	крупная белая	кр.белая х дюррок	крупная белая	кр.белая х дюррок	крупная белая	кр.белая х дюррок
1	2	3	4	5	6	7
Длина кости	9,55±0,02	9,52±0,19	14,9±0,07	15,6±0,42	19,2±0,17	20,0±0,76
Сегментальная ширина:						
дистальн. эпифиза	3,38±0,09	3,42±0,07	4,58±0,09	5,05±0,08*	5,80±0,05	5,65±0,55
проксим. эпифиза	3,27±0,05	3,29±0,08	4,67±0,09	5,12±0,09*	6,03±0,13	6,93±0,35*
диафиза	1,02±0,01	1,05±0,02	1,70±0,01	1,74±0,04	2,05±0,05	2,49±0,13*
Сагитальная ширина:						
дистальн. эпифиза	3,72±0,12	3,78±0,07	5,11±0,16	4,92±0,09	6,00±0,10	6,28±0,32
проксим. эпифиза	2,03±0,04	2,12±0,08	2,67±0,12	2,93±0,04*	3,50±0,12	4,20±0,15*
диафиза	1,12±0,02	1,19±0,04	1,75±0,05	1,94±0,04	2,12±0,06	2,37±0,23
Периметр диафиза	3,78±0,11	3,80±0,11	5,60±0,21	6,37±0,07*	6,77±0,18	7,83±0,48*
Масса кости, г	42,3±2,1	43,8±2,2	116±8,7	134±5,6	229±8,0	315±21*

Таблица 3. Индексы макроморфометрии бедренной кости свиной

Индексы	30 сут		107 сут		208 сут	
	крупная белая	кр.белая х дюррок	крупная белая	кр.белая х дюррок	крупная белая	кр.белая х дюррок
1	2	3	4	5	6	7

продолжение таблицы 3

<i>I</i>	2	3	4	5	6	7
<i>Абсолютной массивности</i>	4,41±0,14	4,59±0,18	7,76±0,56	8,59±0,34	11,9±0,47	15,7±0,56*
<i>Расширенности дистального эпифиза</i>	2,47±0,07	2,20±0,16	2,81±0,04	2,65±0,09	2,83±0,08	2,37±0,21*
<i>Расширенности проксимального эпифиза</i>	3,32±0,13	3,21±0,09	2,13±0,05	2,14±0,07	2,29±0,08	1,99±0,18
<i>Грациальности</i>	2,52±0,03	2,51±0,10	2,67±0,09	2,45±0,06	2,84±0,09	2,56±0,11
<i>Масса кости /масса тела x 10⁻³</i>	4,59±0,07	4,41±0,08	3,41±0,27	3,79±0,12	2,41±0,10	2,83±0,24*

Механические параметры пястных костей 1-мес поросят крупной белой породы были в целом значительно выше, чем у их помесных сверстников. К 3,5-мес возрасту эта разница сгладилась, а к концу откорма у помесных свиней показатели прочности пястных костей на излом, момента изгиба и толщины костных стенок оказались существенно выше, чем у крупной белой породы (табл. 4). Такая же динамика отмечена в отношении концентрации Са и Р в костной ткани. Содержание магния в ней по существу не зависело от генотипа животных (табл. 5).

Таблица 4. Механические характеристики пястных костей свиней

<i>Показатели</i>	<i>30 сут</i>		<i>107 сут</i>		<i>208 сут</i>	
	<i>крупная белая</i>	<i>кр.белая х дюрюк</i>	<i>крупная белая</i>	<i>кр.белая х дюрюк</i>	<i>крупная белая</i>	<i>кр.белая х дюрюк</i>
<i>Прочность на излом, кг/см²</i>	266±28	220±26	233±36	232±27	415±18	489±37*
<i>Момент изгиба, кг-см</i>	54±2,2	39±7,8*	83±6,2	88±5,7	130±5,8	141±6,1
<i>Толщина костных стенок, мм</i>	1,72±0,09	1,35±0,05*	1,88±0,2	1,71±0,09	1,98±0,10	2,15±0,15

Таблица 5. Минеральный состав диафизов бедренных костей свиней (на 100 г сухой обезжиренной ткани)

<i>Эле-</i>	<i>30 сут</i>	<i>107 сут</i>	<i>208 сут</i>
-------------	---------------	----------------	----------------

<i>мен- ты</i>	<i>крупная белая</i>	<i>кр.белая х дюрок</i>	<i>крупная белая</i>	<i>кр.белая х дюрок</i>	<i>крупная белая</i>	<i>кр.белая х дюрок</i>
<i>Ca, г</i>	<i>15,5±0,49</i>	<i>14,0±0,34*</i>	<i>21,2±0,58</i>	<i>21,4±0,28</i>	<i>21,6±0,24</i>	<i>23,5±0,42*</i>
<i>P, г</i>	<i>8,72±0,25</i>	<i>7,91±0,30*</i>	<i>10,4±0,15</i>	<i>10,4±0,06</i>	<i>9,3±0,17</i>	<i>10,2±0,10*</i>
<i>Mg, г</i>	<i>330±25</i>	<i>358±16</i>	<i>459±19</i>	<i>446±17</i>	<i>415±11</i>	<i>421±3,6</i>
<i>Ca : P</i>	<i>1,78</i>	<i>1,77</i>	<i>2,04</i>	<i>2,06</i>	<i>2,32</i>	<i>2,30</i>

Таблица 6. Концентрация минеральных элементов в печени, мышечной ткани, стенке тонкого кишечника и почках свиней (на 1 кг сухого вещества)

Мин эл- ты	30 сут				107 сут				208 сут			
	печень	мышеч. ткань	стенка тонк. кишеч.	почки	печень	мышеч. ткань	стенка тонк. кишеч.	почки	печень	мышеч. ткань	стенка тонк. кишеч.	почки
Крупная белая порода												
Na	2,61±0,12	2,39±0,17	4,13±1,99	4,39±0,02	1,99±0,13	1,59±0,76	5,09±0,77	4,72±0,20	2,93±0,02	1,69±0,08	4,58±0,2	4,72±0,19
K	10,2±0,07	12,6±0,48	14,4±1,7	9,6±0,3	7,42±0,02	11,5±3,9	13,4±0,4	9,9±0,1	7,39±0,04	10,3±0,1	10,0±0,3	9,0±0,2
P	1,45±0,23	0,97±0,03	1,22±0,17	1,39±0,20	1,26±0,02	0,85±0,04	1,16±0,39	1,11±0,02	1,15±0,39	0,74±0,01	1,09±0,3	1,03±0,02
Ca	250±10	246±25	254±14	351±15	166±8,9	247±19	423±54	287±12	193±15	241±11	324±12	337±35
Mg	360±15	770±13	706±20	450±86	468±34	550±17	642±50	500±31	481±19	650±13	599±11	543±60
Zn	93±5,5	51±0,1	38±4,4	51±1,9	53±1,8	32±1,9	40±0,6	57±1,8	68±1,7	45±1,9	40±0,2	57±2,0
Cu	67±6,9	6,9±0,2	9,8±0,2	22±1,5	23±0,4	5,5±0,2	7,3±0,2	29±5,3	24±1,8	5,8±0,2	9,3±0,4	25±2,0
Mn	11,2±0,3	3,2±0,1	3,9±0,2	6,4±0,2	12,4±0,2	3,3±0,2	6,2±0,1	9,0±0,2	8,2±0,2	3,4±0,2	3,9±0,1	7,3±0,2
Fe	461±31	133±14	240±1,7	226±88	520±48	67±0,2	270±18	256±10	516±35	126±7	263±21	310±47
Крупная белая х дюрок												
Na	2,9±0,07*	1,8±0,09*	4,80±0,62	4,32±0,15	2,07±0,11	1,89±1,08	4,4±0,15*	5,20±0,81	2,3±0,32*	2,1±0,01*	5,4±0,19*	4,82±0,21
K	9,7±0,09*	12,3±0,36	12,3±1,7	8,9±0,5	7,67±0,18	10,6±0,4	9,5±0,3*	9,8±0,2	8,2±0,10*	9,9±0,4	11,2±3,8	9,0±0,3
P	1,70±0,12	0,83±0,03	1,16±0,02	1,02±0,21	1,9±0,12*	0,73±0,02	0,95±0,14	0,98±0,03	1,32±0,15	0,66±0,02	1,31±0,19	1,09±0,12
Ca	280±15	222±16	294±34	268±19*	142±1,9	175±15*	398±17	345±11*	335±19*	252±24	462±53*	265±16
Mg	450±70	730±161	657±17*	435±88	416±27	504±13	540±27*	482±70	558±71*	689±14	652±33*	596±70
Zn	97±1,4	34±1,7*	47±1,4*	49±1,8	46±0,7	37±0,5	52±0,8*	54±2,2	72±5,1	59±10*	58±1,1*	59±1,9
Cu	47±2,2*	4,6±0,1*	8,2±0,4*	37±2,0*	24±5,5	7,3±0,6*	6,2±0,5*	32±1,6	34±1,9*	5,5±0,7	7,7±0,2*	26±0,5
Mn	11,4±0,6	2,8±0,3	7,2±0,1*	6,2±0,4	8,2±0,2	3,2±0,1	5,6±0,3	8,9±1,5	12,8±1,8*	4,2±0,1*	6,5±0,7*	10,7±0,6*
Fe	328±28*	110±19	253±1,9	243±27	416±23*	77±1,5	293±12	325±44	710±15*	183±10*	510±40*	506±52*

Примечание: Na, K, P – в г, Mg, Zn, Cu, Mn и Fe – в мг

С увеличением возраста животных от 30 до 208 суток отмечено повышение концентрации Ca, P, Mg в костной ткани, Mn – в мышечной, Mg, Fe – в печени, Na, Mg, Zn, Mn, Fe – в почках, Na, Ca, Zn, Fe – в стенке тонкого кишечника, а также уменьшение концентрации K, P, Mg в мышечной ткани, K, P, Zn, Cu – в печени, K, Mg, Cu – в стенке кишечника. На возрастную динамику содержания отдельных минеральных элементов в изученных органах и тканях влияет и генотип животного. В возрасте 30 суток отмечена достоверная разница в концентрации Na, Zn, Cu в мышечной ткани, Na, K, Cu, Fe – в печени, Ca, Cu – в почках, Mg, Zn, Cu, Mn – в стенке кишечника животных разного генотипа. В конце откорма помесные свиньи отличались более высокой концентрацией Na, Zn, Mn, Fe в мышцах, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Fe – в печени, Mn, Fe – в почках, Na, Ca, Mg, Zn, Mn, Fe – в стенке кишечника. В то же время для помесных свиной была характерна более низкая концентрация меди в стенке тонкого кишечника во все возрастные периоды по сравнению с чистопородными животными (табл. 6).

Корреляционная зависимость между изученными биохимическими показателями и откормочными качествами свиной приведена в табл. 7.

Таблица 7. Коэффициенты корреляции биохимических показателей с откормочными и мясными качествами свиной разного потенциала продуктивности

Показатели	Ге мо гл об ин	Ге ма то кр ит	Це ру ло пл аз ми н	Са в ко ст ях	Р в ко ст ях	П К И	Ж ел ез о в мы ш ца х
Живая масса	+0 ,50	+0 ,73	+0 ,93				
Среднесуточный прирост	+0 ,61	+0 ,61	+0 ,97				
Убойный выход	+0 ,64	+0 ,81	+0 ,91				
Масса мышечной ткани	+0 ,47	+0 ,72	+0 ,91				
Масса костей				+0	+0	+0	

				,94	,51	,93	
Окраска мяса	- 0,5 5	- 0,5 8	- 0,8 8				- 0,7 9
Нежность мяса	+0 ,09	- 0,0 2	+0 ,49				- 0,1 7
Прочность костей на из- лом (ПКИ)				+0 ,65	+0 ,25		
Обхват пясти				+0 ,62	+0 ,37	+0 ,84	

Заключение

Исследования показали, что помесный молодняк свиней (крупная белая х дюрок) отличается большей интенсивностью роста и лучшей конверсией корма на прирост, однако он более требователен к условиям кормления, особенно в раннем возрасте, чем животные крупной белой породы. Показатель активности церулоплазмينا в плазме крови можно использовать для раннего прогнозирования интенсивности роста ($r = +0,97$), убойного выхода и массы мышечной ткани ($r = +0,91$), а также окраски мяса ($r = -0,88$). Для этой цели также можно использовать показатель гематокрита ($r = 0,58-0,81$) и величину гемоглобина крови ($r = 0,47-0,64$). По концентрации кальция в костной ткани можно предсказать ее прочность на излом и общее количество в организме (выход костей). Величина обхвата пясти положительно коррелирует с ее прочностью ($r = +0,84$). Обнаружена отрицательная зависимость между содержанием железа в мышечной ткани и интенсивностью ее окраски. Результаты по использованию активности церулоплазмينا плазмы крови в качестве биохимического теста раннего прогнозирования мясных и откормочных качеств свиней обладают новизной. Тест прост в исполнении и заслуживает широкой апробации.

Показатели активности церулоплазмينا в плазме крови (23-35 мкМ парафенилендиамина/ч/мл), гематокрита (38-45%), содержания кальция в костной ткани (14-21% на сухое обезжиренное вещество), концентрации железа в мышцах (70-120 мг/кг сухой ткани) следует использовать в селекционной работе для раннего прогнозирования (в возрасте 30-105 суток) откормочных и мясных качеств свиней. При бонитировке животных целесообразно делать промер обхвата пясти (8-13 см в возрасте 30-105 суток) для предсказания прочности кости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуткович Я.Л. Прогнозирование зольного состава кормов, продуктивности свиней и потребности их в некоторых минеральных элементах в условиях Среднего Поволжья. Автореф. дис... д. с.-х. н. Ленинград – Пушкин, 1991: 45.
2. Иващук И.С. Эффективность скрещивания в свиноводстве. Зоотехния, 1997, 10: 12-13.
3. Кабанов В.Д. Повышение продуктивности свиней. М., 1983: 256.
4. Кузнецов С.Г. Биологическая доступность минеральных веществ для животных. Обзорная информация. М., ВНИИТЭИагропром, 1992: 52.
5. Мамонтов Н.Т. и др. Центр гибридизации свиней в Тюменской области. Зоотехния, 1998, 10: 22-25.
6. Методики исследований по свиноводству. Харьков, 1977: 151.
7. Методы биохимического анализа (справочное пособие). Боровск, 1997: 356.
8. Сушков В.С. Научные основы технологии производства свинины. Автореф. дис... д. с.-х. н. Саранск, 1997: 42.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ СЕЛЕНОПИРАНА

В.А. Галочкин, Е.М. Колоскова, О.В. Софронова
Лаборатория иммунобиотехнологии

Изучены антиоксидантные свойства нового отечественного, низкотоксичного органического соединения селена – селенопирана. Селенопиран обладает выраженными антиоксидантными свойствами, превосходящими общепринятые в животноводстве и медицине антиоксиданты – бутилокситолуол и витамин Е. В отличие от этих двух биоантиоксидантов селенопиран способен не только предотвращать перекисное окисление липидов, но обладает уникальными свойствами нейтрализовать образовавшиеся ранее свободные радикалы.

Введение

Ряд заболеваний и нарушений функционирования различных систем организма инициируется и сопровождается интенсивным образованием продуктов перекисного окисления липидов и накоплением сверхактивных свободных радикалов. Ослабленная иммунная система и недостаточная активность ферментов естественного антиоксидантно-антирадикального комплекса защиты организма не справляются с возникшей ситуацией, что приводит к дальнейшему усугублению заболевания и ухудшению состояния здоровья человека или животного. Из-

вестно влияние антиоксидантов (АО) на повышение неспецифической резистентности организма, стрессустойчивости животных, радиоустойчивости, повышение продуктивности (1). По этой причине ученые всего мира уделяют самое пристальное внимание природным и синтетическим антиоксидантам, всесторонне исследуя их свойства. Соответственно возникает необходимость в сравнительной оценке антиоксидантной активности (АОА) предлагаемых к использованию веществ. В качестве стандартного жирорастворимого антиоксиданта обычно используют ионол (агидол, 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол, бутилокси-толуол), АОА которого принята за интернациональный эталон.

В научной практике АОА синтетических и природных жирорастворимых антиоксидантов в системах *in vitro* оценивают по их способности тормозить реакцию термического окисления метилового эфира олеиновой кислоты (1). Однако достаточно объективную модель сравнительной активности антиоксидантов можно получить и при использовании более простой и дешевой среды – растительного масла, в состав которого входят как ненасыщенные свободные жирные кислоты, так и их эфиры, склонные к процессу автоокисления при нагревании, длительном хранении, действии света, доступе воздуха. Иницирование процесса окисления растительных масел осуществляется ионами металлов переменной валентности, присутствующими в масле в незначительных количествах, и резко ускоряется при повышении температуры хранения масла. Так, при хранении в течение 6 месяцев при комнатной температуре подсолнечного масла с β -каротином, расфасованного во флаконы темного стекла, перекисное число возрастает в 50 раз. При 60° С идет ускоренное накопление перекисей. Добавление антиоксидантов (ионол, витамин Е, аскорбилпальмитат и др.) существенно замедляет процесс (2).

По результатам предшествующих исследований лаборатории иммунобиотехнологии новое низкотоксичное органическое соединение – селенопиран, внесенное в жиры и корма, проявляет антиоксидантные свойства, не уступающие традиционно применяемым в животноводстве и медицине антиоксидантам. После внесения селенопирана в жиры и корма предотвращается перекисное окисление липидов, улучшаются их потребительские качества, увеличивается срок хранения.

Целью настоящего исследования являлось сравнение АОА селенопирана с некоторыми общепризнанными антиоксидантами, широко применяемыми в животноводстве при производстве премиксов, в масло-жироперерабатывающей промышленности, в частности, агидола (ионола) и синтетического витамина Е, продолжающего оставаться одним из самых популярных антиоксидантов в медицине.

Материалы и методы

Изучали влияние различных концентраций выбранных антиоксидантов на процесс накопления перекисных соединений при разных температурах как в традиционной метилолеатной системе, так и в растительном масле при его автоокислении. Использовали селенопиран, синтезированный в лаборатории иммунобиотехнологии по методу Блинохвотова А.Ф. (3) (перекристаллизованный из ацетона), агидол кормовой (ионол, производства Стерлитамакского нефтеперерабатывающего завода), витамин Е (кремниевая кислота в качестве наполнителя, 50%, производитель ЗАО Г.Р. №29682, РОН-Пуленк). Последние два вещества в настоящее время широко применяются в животноводстве в составе премиксов. Концентрации всех изучаемых антиоксидантов брали в пределах 0,005-0,05%, т.е. близкими к рекомендуемым в пищевой и комбикормовой промышленности для замедления окисления растительных и животных жиров (4). В качестве модели для оценки процесса накопления перекисей брали метиловый эфир олеиновой кислоты и пищевое рафинированное дезодорированное подсолнечное масло (Deltex, Югославия). Количество естественных антиоксидантов и консервантов, содержащихся в масле, не устанавливали.

Необходимую концентрацию антиоксидантов создавали внесением расчетного количества их маточных растворов в образцы масла и метилолеата. Окисляемые субстанции, с внесенными тестируемыми антиоксидантами, разносили по чашкам Петри (удельная поверхность составляла в среднем 1,2 см²/г, доступ воздуха – свободный) и помещали в термостат при заданной температуре. Контролем служили образцы без добавления сравниваемых антиоксидантов.

Концентрацию перекисей определяли по Велеру в модификации Березина И.В. (5) – йодометрическим методом, основанном на взаимодействии образующегося активного перекисного кислорода с йодистоводородной кислотой и последующем титровании выделившегося йода тиосульфатом натрия.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные по влиянию различных концентраций селенопирана на динамику накопления перекисей в системе термического окисления метилового эфира олеиновой кислоты (t 60° С, при постоянном барботировании воздухом). Прежде всего, обращает на себя внимание факт наличия у этого органического соединения селена выраженной антиоксидантной активности, и это заключение справедливо для всех трех испытанных концентраций селенопирана во всех изученных временных интервалах. Четко прослеживается строгий до-

зозависимый антиоксидантный эффект. Даже при наименьшей из испытывавшихся концентраций (0,012 %), через 9 часов инкубации количество образовавшихся перекисей было в 2 раза ниже, чем в контроле. За 7-часовой временной отрезок в системе с 0,125 % селенопирана практически полностью предотвращалось образование перекисей, а через 9 часов их было существенно меньше, чем при двух более низких концентрациях селенопирана и в 5 с лишним раз меньше, чем в контроле.

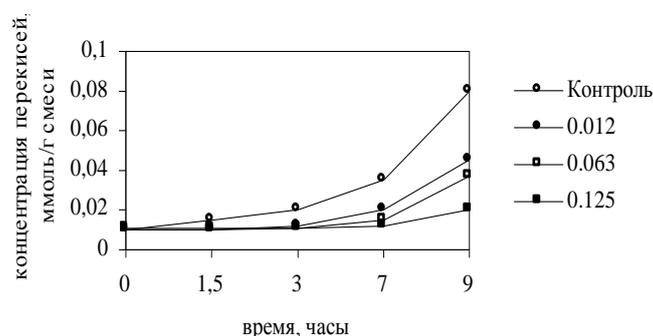


Рис. 1. Влияние разных концентраций селенопирана (0,012; 0,063 и 0,125%) на динамику накопления перекисей в метилолеатной системе

Следующая задача заключалась в сопоставительном анализе антиоксидантной активности селенопирана и эталонного антиоксиданта бутилокситолуола (оба антиоксиданта использовались в концентрации 0,1 %). Полученная информация суммирована на рис. 2. Весьма четко и однозначно прослеживаются преимущества селенопирана. Если через 8 часов инкубации в системе с селенопираном количество образовавшихся перекисей было не только ниже, но и сам процесс их образования стабилизировался (кривая вышла на плато), то в присутствии бутилокситолуола процессы липопероксидации продолжали линейно возрастать.

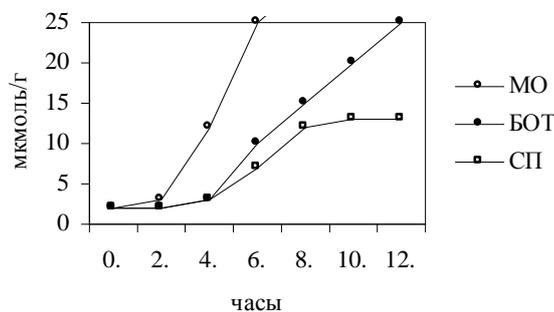
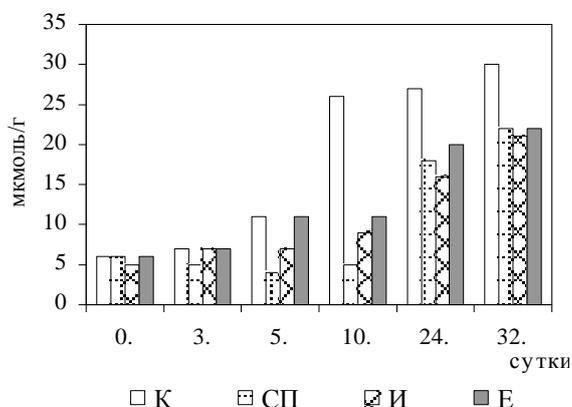


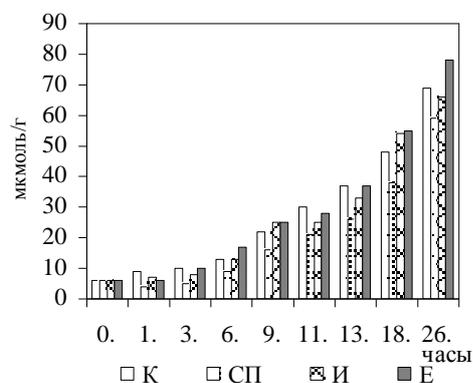
Рис. 2 Динамика накопления перекисей в метилолеатной системе (МО) в присутствии селенопирана (СП) и бутилокситолуола (БОТ)

На следующем этапе исследований предпринята попытка более детального сравнительного изучения 3-х антиоксидантов при четырех температурных режимах (20, 40, 60 и 80°C) в широком временном диапазоне от 26 часов до 32 суток. Как видно из диаграмм (3 – 5), скорость процесса автоокисления растительного масла в существенной степени зависит от температуры: если концентрация перекисей около 20 мкмоль/г при 20°C в контрольном образце достигается приблизительно за 10 суток, то при 80°C это же количество образуется всего за 9 часов. При температуре 20°C все испытуемые образцы проявили свои антиоксидантные свойства примерно на одинаковом уровне, однако, при повышении температуры до 80°C витамин Е показал себя в качестве прооксиданта: концентрация перекисей в образце практически на всем протяжении эксперимента превышала таковую у контрольного образца. Инол при значительном повышении температуры практически утратил свои АО свойства и лишь селенопиран полностью продемонстрировал свои способности, хотя при более низких температурах показал себя немного более слабым антиоксидантом, чем инол.

Рис. 3. Влияние температуры на образование перекисей в растительном масле, содержащем 0,01% испытуемых антиоксидантов при 20°C. (Условные обозначения: К – контроль, СП – селенопиран, И – инол, Е – витамин Е)



Самое значимое наблюдение заключается в том, что во всех экспериментах, без единого исключения, при всех концентрациях антиоксидантов, при всех температурных режимах только в образцах, содержащих селенопиран, на протяжении первой фазы каждого опыта всегда наблюдали значительное уменьшение содержания перекисей по сравнению с тем количеством, которое уже изначально содержалось в использовавшихся для опытов маслах. Следовательно, селенопиран, в отличие от инола и витамина Е, не только тормозит процесс перекисного окисления липидов, но и способен к дозозависимой нейтрализации уже имеющихся в системе перекисей. При использовании достаточно высоких концентраций СП (0,5%) концентрация перекисей, сни



звившаяся вначале вдвое по сравнению с исходной, к концу опыта едва превышала таковую, тогда как содержание перекисей в контрольном образце превышало исходный уровень более чем в 7 раз. Полученная новая информация не может быть проинтерпретирована иначе, чем убедительное доказательство способности селенопирана выполнять функцию «метаболических ловушек» свободных радикалов.

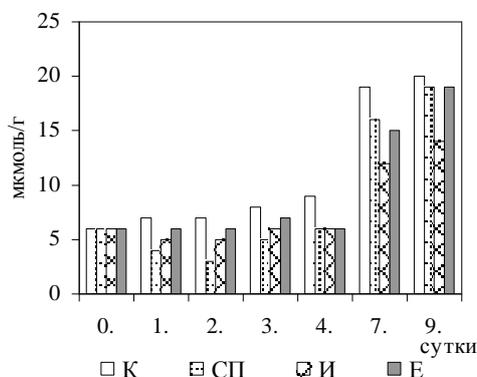
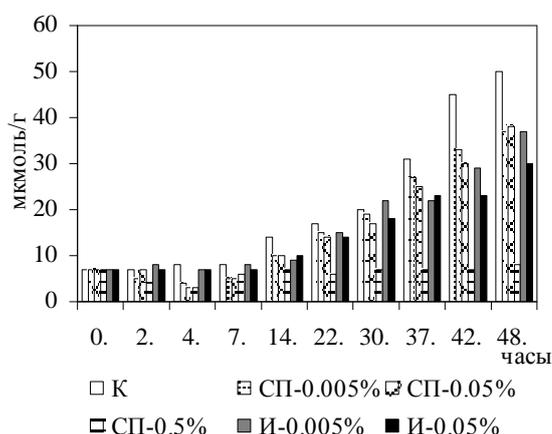


Рис. 4. Образование перекисей в растительном масле, содержащем 0,01% испытуемых антиоксидантов при температуре 40°C (а) и 80°C (б)

Рис. 5. Влияние разных концентраций селенопирана и ионола при 60°C на образование перекисных соединений в растительном масле.



Внимание зарубежных исследователей, специалистов в области селеноорганических соединений, в последние 10 – 15 лет приковано к изучению свойств нового органического соединения – эбселена (1,2-бензизоселеназол-3(2)-он), проявляющего самостоятельные глутатионпероксидазные свойства, продемонстрированные рядом экспериментов (6). Предложенный механизм взаимодействия эбселена с органически-

ми перекисными соединениями, с нашей точки зрения, вполне применим для объяснения аналогичных химических свойств селенопирана.

Заключение

В результате проведенных исследований продемонстрировано не только дозозависимое ингибирующее действие селенопирана на процесс перекисного окисления липидов, не уступающее, а зачастую и превосходящее антиоксидантные свойства наиболее часто применяемых в практике препаратов, но и непосредственная нейтрализация им уже имеющихся в среде пероксидов. Необходимо проведение дополнительных исследований, способных дать количественные характеристики описанных процессов. Необходимо также проведение специальных экспериментов по выявлению у селенопирана глутатионпероксидазных свойств. Такие исследования необходимы для дальнейших поисков областей применения селенопирана в животноводстве в качестве антиоксидантного, адаптогенного, иммуномодулирующего и ростостимулирующего препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б. и др. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука, 1975.
2. Карагодина З.В. и др. Оценка эффективности антиоксидантов, введенных в растительное масло с β -каротином. Биоантиоксидант. 4-я конференция. Тезисы докладов. М., 1992: 171.
3. Блинохватов А.Ф., Харченко В.Г. Авторское свидетельство № 1075672, 1983.
4. Руководство по методам исследования, теххимическому контролю и учету производства в масложировой промышленности. Ленинград, 1967: 1.
5. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo*. М.: Наука, 1992: 30.
6. Sies H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. Free Radical Biol. Med., 1993, 14: 313-323.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ СЕЛЕНА В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

О.Б. Брускова

Лаборатория минерального питания

В обзоре изложены литературные данные о влиянии селена на организм человека и животных. Показано, что основной функцией селена является защита организма от перекисного окисления липидов

клеточных мембран через глутатионпероксидазу. Одновременно, нормализуя обмен протеинов и нуклеиновых кислот, селен улучшает репродуктивную функцию животных, повышает адаптацию организма к неблагоприятным факторам, предотвращает развитие окислительного стресса и свободнорадикальных болезней (атеросклероза, некроза печени, панкреатитов, алиментарной мышечной дистрофии и др.), регулирует специфический и неспецифический иммунитет.

Метаболизм селена. Жизненная необходимость селена была установлена в ходе классических экспериментов, продемонстрировавших, что именно этот микроэлемент (МЭ) предупреждает возникновение некрозов в печени у крыс. Вскоре был открыт еще ряд заболеваний, излечиваемых селеном, к числу которых относятся беломышечная болезнь овец и крупного рогатого скота, алиментарный гепатит свиней, экссудативный диатез домашней птицы, причинявших значительный ущерб животноводству на обширных сельскохозяйственных угодьях, где почвы и растения содержали пониженное количество селена.

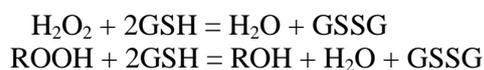
В связи с близостью биологического действия селена и витамина Е одно время допускалась их взаимозаменяемость. Однако в ряде работ было установлено, что животные испытывают потребность в селене даже при обеспеченности их витамином Е. Явления специфической недостаточности селена включают некроз и фиброз поджелудочной железы у цыплят, облысение, повреждение стенок кровеносных сосудов, катаракту, задержку роста и нарушение репродуктивной функции у крыс (3, 4, 21).

Роль селена в патологии человека и животных была установлена после описания селенодефицитной кардиомиопатии в Китае (болезнь Кешана), а также явлений недостаточности селена при полном парентеральном питании. Характеристика селенодефицитных заболеваний устанавливается только в последние годы. Представляет интерес также антибластическое действие селена и его способность противодействовать токсическому влиянию тяжелых металлов (4, 13, 14).

Всасывание селена может осуществляться через пищеварительный тракт, кожу и легкие. Наиболее интенсивное его всасывание происходит в двенадцатиперстной и в несколько меньшей степени – в тощей и подвздошной кишках. В желудке селен практически не усваивается (3). Транспорт и депонирование селена осуществляются, по видимому, особыми белками, содержащими селеноцистеин, и названными соответственно селенопротеином Р из плазмы крови и селенопротеином Р из почек и печени. В живой природе найдены различные соединения селена, являющиеся главным образом производными селеносодержащих аминокислот и продуктами метилирования селена. В бактериях, грибах, ряске, клевере, плевеле, пшенице найдены селено-

метионин и селеноцистеин. Последний присутствует также в глутатионпероксидазе млекопитающих и в ряде белков плазмы крови, семенников, мышц. В качестве кофактора в ряде окислительно-восстановительных ферментов селен присутствует один или вместе с железом и молибденом (1, 5, 7).

Глутатионпероксидаза – первый селенсодержащий фермент, найденный в организме млекопитающих. Он предохраняет клетки от токсического действия перекисных радикалов. Фермент не обладает строгой специфичностью по отношению к перекисям и нуждается в качестве кофактора в глутатионе, который в ходе ферментативной реакции подвергается окислению:



В этой реакции электрон, однако, переносится на перекись не с восстановленного глутатиона, а с селенола, который при этом переходит в селенистую кислоту, а затем последняя регенерируется в селенол восстановленным глутатионом (1, 5).

Взаимосвязь между селеном и витамином Е объясняется их воздействием на разные этапы образования органических перекисей. Токоферолы служат антиоксидантами по отношению к насыщенным липидам плазматической мембраны, предохраняя их от разрушения свободными радикалами, образующимися под действием ферментов и различных окислительных агентов и индуцирующими автокаталитическую цепную реакцию окисления ненасыщенных жирных кислот. Токоферолы ингибируют эти процессы, перехватывая, по-видимому, образующиеся радикалы. Селеносодержащая глутатионпероксидаза разрушает как перекись водорода, так и перекиси липидов, тогда как субстратом не содержащей селен глутатионпероксидазы (синоним: глутатион-S-трансфераза В) и каталазы является только перекись водорода. При перекисном окислении липидов возникает малоновый диальдегид, который выступает в качестве сшивающего агента, образуя шиффовы основания с аминокетонами белка. В результате появляются белково-липидные комплексы, относимые к липофусцинам (15, 18).

Применение витамина Е позволяет значительно снизить уровень селена, необходимый для предупреждения экссудативного диатеза домашних птиц, всего до 10 нг/г МЭ в рационе, тогда как без добавления витамина Е аналогичный эффект оказывали только 50 нг/г селена. Аналогичные наблюдения имеются и в отношении миопатии и зоба у индюков и недостаточности селена у свиней (20).

Селен в железосеропротеидах. В опытах *in vitro* установлено, что селен может замещать кислотнo-лабильную серу в путидаредоксине, аденодоксине и ферродоксине, сохраняющих при этом свою био-

логическую активность. В этой связи предложена гипотеза (13), согласно которой одной из биохимически активных форм селена может являться селенид, находящийся в активном центре еще неидентифицированных негемовых железопротеидов. Было установлено, что кислотнo-лабильный селен связан главным образом с мембранами митохондрий и агранулярной эндоплазматической сети. Селену принадлежит специфическая, зависящая от витамина Е, роль в эндоплазматическом ретикулуме, где этот элемент входит в состав негемового железопротеида X. Он функционирует в качестве переносчика электронов между флавопротеидом и цитохромом P-450 НАДФН-зависимой цепи переноса электронов микросомной фракции печени крыс (18). В соответствии с этой гипотезой устанавливается еще один аспект взаимодействия между селеном и витамином Е, а именно защита этим витамином кислотнo-лабильного селена в составе железопротеидов от окисления кислородом. Следует однако отметить, что попытки выделения из микросомной фракции витамина Е и селензависимого железопротеида, неустойчивого к окислителям, пока не увенчались успехом.

Митохондриальный транспорт электронов. Одним из наиболее ранних биохимических сдвигов, описанных при дефиците селена и витамина Е у крыс, была неспособность гомогенатов и срезов печени поддерживать нормальный уровень дыхания после длительной инкубации *in vitro*. Селен оказался прекрасным катализатором восстановления цитохрома с тиолами, и в мышцах овец был описан селенопротеид, содержащий гем, близкий по своей структуре к цитохрому С. Все же для выяснения роли селена в дыхательной цепи митохондрий необходимо проведение дополнительных исследований (5, 15, 18).

По данным ряда авторов (2, 8) воздействие селенита натрия на культуру клеток, HeLa вызывало деструктивные изменения митохондрий: при низких концентрациях МЭ – локальное просветление матрикса, расширение межкристиных промежутков, усиление полиморфизма, а при больших концентрациях (10 мкмоль/л) – набухание митохондрий, лизис крист и нередко полную утрату структурированности этих органелл. Часть митохондрий переходила в так называемое конденсированное состояние.

Селенат образуется в организме животных лишь в незначительных количествах, а при введении через рот или парентерально, он быстро выводится с мочой, причем его выделение усиливается сульфатами. Селенит в отличие от сульфита – довольно сильный окислитель и легко восстанавливается органическими соединениями до серого или красного элементного селена. Окисление селенита сульфитоксидазой, катализирующей превращение сульфита в сульфат, в организме животных, по-видимому, не происходит. Отсутствуют данные и об образовании селенита из селеноаминокислот, тогда как сульфит образуется

из цистеина через цистеинсульфинат. Восстановление селенита в клетках катализируется ферментом глутатионредуктазой после неферментативной реакции селенита с глутатионом (14).

H_2Se способен вступать в реакцию с металлами, образуя нерастворимые комплексы, понижающие биологическую доступность селена и металла. Это взаимодействие лежит в основе снижения токсичности металлов повышенными дозами селена. Образование биологически недоступных соединений селена с металлами объясняет способность серебра, кадмия и др. вызывать у животных вторичную недостаточность селена и блокировать синтез глутатионпероксидазы даже на рационах, содержащих адекватное количество селена. Детоксикационное действие селена по отношению к металлам, при их большом избытке, может быть связано со способностью этого МЭ восстанавливать дисульфидные связи в белках в SH-группы, которые затем «улавливают» тяжелые металлы (3, 13, 22).

Предполагается, что селен вовлекается в целый ряд анаболических процессов в форме H_2Se , например при синтезе глутатионпероксидазы, при перфузии печени селенитом (1, 9). Аналогичным путем происходит, по-видимому, синтез и других функциональных и нефункциональных селенопротеидов. Существуют две гипотезы о включении селена в состав глутатионпероксидазы – трансляционная и посттрансляционная. Согласно первой, синтез селеноцистеина происходит путем переноса селеноводорода на соответствующей акцептор, например на О-ацетилсерин. Затем образовавшийся селеноцистеин с помощью специфической транспортной РНК может быть включен в полипептидную цепь.

Посттрансляционная гипотеза допускает включение неорганического селена в предобразованную полипептидную цепь в процессе ее посттрансляционной модификации. Имеются экспериментальные данные, свидетельствующие, что при перфузии печени селен из его неорганических соединений включается в состав глутатионпероксидазы с большей скоростью, чем из селеноцистеина (22). Это предполагает существование особой формы фермента – преглутатионпероксидазы, содержащей вместо селеноцистеина цистеин или серин, который подвергается превращению в селеноцистеин под влиянием специфической селеноцистеинилсинтетазы (18).

Из организма селен элиминирует тремя основными путями – через почки, кишечник и выдыхаемый воздух. Однако в большинстве экспериментов и клинических наблюдений установлено, что в физиологических условиях гомеостаз селена регулируется в основном экскрецией этого МЭ с мочой (5) в течение 24 ч после его введения.

Гипо- и гиперселенозы. Наиболее известным проявлением недостаточности селена у животных является алиментарная мышеч-

ная дистрофия (беломышечная болезнь), причиняющая значительный экономический ущерб животноводству в различных странах. Заболевают в основном новорожденные животные и молодняк до 12-месячного возраста, болезнь может иметь длительное течение, часто заканчивается летально, характеризуется очаговой дегенерацией различной тяжести и некрозом скелетной и сердечной мышц невоспалительного характера; она предупреждается и излечивается включением в рацион селена.

Патоморфологические изменения при этом хроническом заболевании характеризуются глубокими нарушениями скелетных мышц и миокарда. В частности, наблюдается пестрая патогистологическая картина за счет неравномерного полнокровия, дистрофических и некробиотических изменений кардиомиоцитов, нередко с явлениями дистрофического обызвествления. По мнению А.П. Авцына и соавт. (8) белая окраска мышц обусловлена исчезновением из них миоглобина и вторичным коагуляционным некрозом миоцитов. В печени и почках постоянно отмечаются дистрофические процессы. Изменения в легких, кишечнике и других органах неспецифичны и непостоянны. Изменения миокарда и скелетных мышц имеют дегенеративно-некробиотический характер. Часто встречается гиалиновая дегенерация мышечных волокон. Ткань печени и почек в большинстве случаев находится в состоянии зернистой, реже жировой дистрофии (3). Другими исследованиями было показано, что недостаток селена играет специфическую роль также в развитии токсической дистрофии печени животных и птиц, экссудативного диатеза птиц и ряда других заболеваний (15, 21). Содержание мышшей и крыс на полусинтетическом аминокислотном рационе с низким содержанием селена сопровождалось резким понижением уровня других МЭ, например цинка в клетках панкреатических островков, в паренхиме почек и в клетках сперматогенного эпителия (5).

Биохимические исследования при беломышечной болезни продемонстрировали резкое снижение количества миозина в мышцах и фракции водорастворимых белков одновременно с увеличением количества коллагена, что согласуется с гистологическими наблюдениями, показавшими замещение мышечных волокон соединительной тканью. Одновременно отмечено снижение уровня креатинфосфорной кислоты, АТФ, гликогена с параллельным возрастанием неорганических фосфатов, увеличением активности аминотрансфераз, в некоторых случаях АТФазы и пирогосфатазы мышц (2, 3, 12).

При беломышечной болезни ягнят резко активируются коллагеназа мышц, липопротеинлипаза миокарда и ряд других ферментов (15). Было отмечено, что в сердечной мышце телят с этим заболеванием изменяется состав фосфолипидов. Считают, что именно исчезновение одного из селенопротеидов – белка с молекулярной массой 10 000 в

скелетных мышцах овец при недостаточности селена в известной мере обуславливает возникновение этого заболевания скота (5).

Биологическая роль селена может быть также связана с его влиянием на метаболизм серы. При беломышечной болезни в мышечной ткани ягнят отмечены значительное снижение общего количества SH-групп и их содержания в белках и существенное увеличение числа небелковых SH-групп и концентрации восстановленного глутатиона. Повышенное количество небелковых SH-групп и снижение их числа в белках печени отмечены также у крыс при дефиците селена. Из этих опытов был сделан вывод, что при дефиците этого МЭ нарушен процесс образования дисульфидных связей (1, 5).

В последние годы дефицит селена рассматривают как возможный этиологический фактор при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях. Еще в 1938 г. у людей была впервые выявлена болезнь Кешана. Однако систематическое изучение этого заболевания было проведено в 60-х годах только в Китае, где оно носит эндемический характер и предотвращается введением селенита натрия. Болезнь Кешана представляет собой эндемическую фатальную миокардиопатию, для которой характерны аритмии, увеличение размеров сердца, фокальные некрозы миокарда, за которыми следует сердечная недостаточность. Электронно-микроскопические исследования дополнили картину поражения миокардиоцитов. Так, наряду с увеличением числа митохондрий выявлены их набухание с резким просветлением матрикса и разрушением крист, а также появление так называемых конденсированных форм этих органелл. Авторы показали дезорганизацию саркомеров, разрывы сарколеммы, изменение морфологии вставочных дисков, увеличение числа лизосом (13).

Фиброз экзокринной части поджелудочной железы, вызванный дефицитом селена, был впервые описан у цыплят, получавших синтетический корм на основе кристаллических аминокислот, содержащий менее 0,015 мг/кг селена и повышенные дозы витамина Е. Алиментарная дистрофия поджелудочной железы (АДП) характеризуется выраженной стеатореей, обусловленной снижением активности панкреатической липазы и понижением уровня токоферола в плазме крови, который возвращается к норме при включении в пищу свободной линолевой кислоты. При электронно-микроскопических исследованиях ацинарных клеток поджелудочной железы цыплят с недостаточностью селена отмечены разрывы внешней и внутренней мембран митохондрий, а также снижение на 27% количества митохондриальных белков. Эти данные позволяют считать, что причиной АДП является уменьшение числа функционально активных митохондрий в ацинарных клетках. Однако неясно, связано ли повреждение митохондрий с дефицитом глутатионпероксидазы или другого селенсодержащего фактора. Против исключительной роли глутатионпероксидазы в этом процессе

свидетельствуют, в частности, отсутствие корреляции между активностью данного фермента в плазме крови и в ткани поджелудочной железы и течением болезни, а также больший лечебный эффект селена, находящегося в составе селенометионина и пшеницы, чем селенита и селеноцистеина, наиболее эффективных при беломышечной болезни (11, 22).

Алиментарный гепатоз получен в экспериментах на крысах, а в природно-хозяйственных условиях зарегистрирован в Новой Зеландии и скандинавских странах при скармливании свиньям зерна местного производства, бедного селеном. Заболевание встречается наиболее часто у поросят в возрасте 3- 15 недель и характеризуется высокой смертностью. При вскрытии отмечены тяжелые некротические изменения печени, обширный отек и отложение цероидного пигмента в жировой ткани, придающего ей желто-коричневую окраску. Селен полностью предохраняет от этого заболевания, но витамин Е более эффективно предупреждает сопутствующие мышечную дистрофию и отложение пигмента (21).

Экспериментальные исследования (11) привлекли внимание к еще одной форме селенодефицита, протекающего на фоне недостаточности витамина Е – эозинофильному энтериту (ЭЭ) человека, домашних и лабораторных животных. ЭЭ с эозинофилией периферической крови возникал в условиях пищевого дефицита селена и витамина Е и закономерно излечивался с помощью добавки этих веществ в корм. Очаговая или диффузная инфильтрация наблюдалась в кишечнике, желудке, брыжейке и регионарных лимфатических узлах, но она достигала наибольшей выраженности вокруг очагов некроза гладких мышц в стенке кишки. Первоначальные предположения о связи этой своеобразной инфильтрации с пищевой аллергией и глистной инвазией не подтвердились. Более вероятно ее зависимость от очагов некроза. В 1975 г. были открыты мощные хемотаксические для эозинофилов вещества в виде продуктов окисления арахидоновой кислоты, в метаболизме которой играют роль селен и витамин Е (5). Таким образом, ЭЭ и эозинофилия, вероятно, возникают в результате избыточного образования продуктов окисления. Селенодефицит может вызвать у крыс также некроз мышц, тубулярный нефроз, очаговые некрозы печени и гемолиз эритроцитов, которые излечиваются препаратами селена и витамина Е. Последний проявляет антиокислительное действие с помощью механизмов, инактивирующих свободные радикалы, в то время как селен, входящий в состав глутатионпероксидазы, катализирует восстановление токсичных перекисей водорода.

У жвачных животных описан еще ряд заболеваний, излечиваемых селеном. К их числу относятся задержка роста и развития овец и крупного рогатого скота в Новой Зеландии, западных штатах США и Шотландии, паралитическая миоглобинурия крупного рогатого, за-

держка отделения плаценты у коров, периодонтоз у овец, причем во многих случаях получен лечебный эффект и от применения витамина Е. Селен обладает также способностью в дозах, превышающих физиологическую потребность (0,1 мг/кг), стимулировать иммуногенез. Так, при даче селена в дозах 0,7-2,8 мг на 1 кг корма у мышей повысился титр антител против овечьих эритроцитов в 7 и 30 раз соответственно. Сходное действие оказало и внутрибрюшинное введение 3-5 мкг селенита натрия, причем наиболее высокий эффект был получен при введении его одновременно с антигеном или до него (10, 13, 17).

Воспроизводительная функция. У всех изученных видов животных дефицит селена вызывает нарушение воспроизводительной функции. Крысы при дефиците селена не утрачивают способность приносить потомство, но уже первое поколение лишено этой способности. У одной части самцов сперматозоиды теряют подвижность, хвост отрывается от головки, у других – сперматозоиды полностью отсутствуют. Самки приносят всего 1-2 нежизнеспособных детеныша. У кур и индюков дефицит селена приводит к снижению яйценоскости и выводимости цыплят (6, 11).

В Новой Зеландии установлена тесная связь между распространением беломышечной болезни и яловостью овец, которая предупреждается дачей 4 мг селенита натрия на животное с месячными интервалами. При дефиците селена течка, овуляция, оплодотворение и раннее развитие плода у овец протекают нормально, но на 3-4-й неделе суягности (примерно ко времени имплантации) эмбрионы погибают по неизвестной причине. Во всех случаях нарушений воспроизводительной функции введение животным одного витамина Е не дает положительного эффекта. Улучшение воспроизводительной функции у овец и крупного рогатого скота при совместной даче селена и витамина Е отмечено в ряде селенодефицитных биогеохимических провинций Шотландии и Калифорнии (19, 22).

Наиболее типичными симптомами селенового токсикоза являются поражения ногтей и волос. Кроме того наблюдается желтушность, шелушение эпидермиса, повреждения эмали зубов, артриты, анемия, нервные расстройства. В биогеохимических селеновых провинциях у людей встречаются хронические дерматиты, постоянная усталость и потеря аппетита, депрессия, гастроэнтериты, дегенерация печени и увеличение размеров селезенки (23). Избыток селена в среде неблагоприятно влияет на процессы оксификации и на состояние зубов. При высоком содержании этого МЭ в питьевой воде у людей нарушается формирование эмали, снижается поступление кальция без изменения усвоения фтора (16).

Наконец, существуют немногочисленные данные о тератогенном действии селена. Этот МЭ в органической или неорганической форме относительно легко проникает через плаценту в плод. Селен в

концентрации 3 мкг/г вызывает уменьшение числа особей в помете третьего поколения у мышей и крыс. При экспериментальном повышении уровня этого МЭ в организме матери отмечаются дефекты развития эмбрионов у кур, крыс, свиней, овец и кошек (5).

Таким образом, анализ литературы позволяет считать твердо установленным существование в организме сбалансированного механизма, поддерживающего гомеостаз селена. Этот микроэлемент интенсивно включается в обменные процессы клетки. По-видимому, частично его метаболизм сходен с обменом серы, но по ряду признаков между ними есть и коренные отличия. Для селена характерны активное участие в окислительно-восстановительных и антиоксидантных процессах, дыхании клетки, а также в синтезе специфических функциональных белков, содержащих селениды. Одновременно, нормализуя обмен протеинов и нуклеиновых кислот, селен улучшает репродуктивную функцию животных, предотвращает развитие окислительного стресса и свободнорадикальных болезней (атеросклероза, некроза печени, панкреатитов, алиментарной мышечной дистрофии и др.), регулирует специфический иммунитет. Избыток селена в рационе животных вызывает гиперселенозы.

Анализ научных данных о биологической роли селена проведен нами в связи с изучением влияния пролонгированных форм селена на жизнедеятельность и воспроизводительную функцию свиней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Ф.И. Некоторые биохимические аспекты действия селена на организм животного. Усп. совр. биологии, 1989, 108, 2(5): 279-288.
2. Воскресенский О.Н. Бобырев В.Н. Биооксиданты – облигатные факторы питания. Вопр. мед. химии, 1992, 4: 21-26.
3. Ермаков В.В., Ковальский В.В. Биологическое значение селена. М.: Наука, 1974, 300.
4. Смоляр В.И. Гипо- и гипермикроэлементозы. Здоровье, 1989: 152 с.
5. Сучков Б.П., Штутман Ц.М., Халмурадов Д.Г. Биохимическая роль селена в организме животных. Укр. биохимический журнал, 1978, 50, 5: 659-672.
6. Георгиевский В.И., Анненков Б.Д., Самохин В.Т. Минеральное питание животных. М.: Колос, 1979: 471 с.
7. Петрович Ю.Д., Подорожная Р.П. Селеноэнзимы и другие селенопротеиды и их биологическое значение. Усп. совр. биологии, 1981, 91, 1: 127-144.
8. Авцын А.П., Строчкова Л. С., Жаворонков А. А. I-я Всесоюзная конференция патологии клетки. М., 1987: 197.
9. Arthur J.R., Nocol F., Beckefct G.J. Hepatic iodthyronine 5-deiodinase. Biochem. J., 1990, 5: 537-540.

10. Binns R.L. Cellular immunology in the pig. Proc. R. Soc. Med., 1973, 66, 8: 1115-1160.
11. Campbell D.R., Combs G.E. The effect of selenium supplementation in diets fed to starting, growing and finishing swine. Reseach. rep., 1987, 32: 1-7.
12. Gombs G.F. Antioxidants and Disease Prevention. CKC Press, Boca Katon - New York, 1997: 97 - 113.
13. Diplock A.T. Trace elements in human health with special reference to selenium. Amer. J. Clin. Nutr., 1987, 5: 1313-1322.
14. Ganther H.F. Chemistry and metabolism of selenium. Selenium in Biology and Medicine.: 3rd Int. Symp. - N.-Y., 1987: 53-65.
15. Jairial I.C., Halder D., Wadewits A. G. Effects of dietary selenium of lipid peroxidation, mitochondrial function and profiles in heart on the myopathics syrian golden Hamster (BJ0146). Biochem. Diophys. Res. Comm., 1987, 144, 2: 815-820.
16. Jonkins K.J., Winfer K.A. Effects of selenium supplementation of naturally high selenium swine rations on tissue levels of the elements. Can. J. Anim. Sci., 1973, 53, 3: 561-567.
17. Larsen H.J.S. Relations between selenium and immunity. Norwegian J. of Agric. Sciences, 1993, 11: 105-119.
18. Levander O.A. Human and animal nutrition. Trace elements (ed M. Mertz). - N.Y.: Acad. Press., 1986, 2: 209-279.
19. Mahan D.C. and Kim Y.Y. Effects of inorganic or organic selenium at two dietary levels on reproductive performance and tissue selenium concentrations in first-parity gilts and their progeny. J. Anim. Sci., 1996, 74(11): 2711-2718.
20. Nahan D.S., Maxon A.Z. Effects of increasing the levels of inorganic selenium supplementation in the post weaning diets of swine. J. Anim. Sci., 1978, 46, 2: 180-190.
21. Schwarz K., Foltz C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. Am. Chem. Sci., 1957, 79: 3292 - 3293.
22. Underwood E.J. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 4th ed. Academic Press, New York, 1977.
23. Wilfer Ch.G. Toxicology of selenium: a review. Clin. Toxicol., 1980, 17: 171-230.

**СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ И
ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ СВИНЕЙ
РАЗНОГО ВОЗРАСТА И ГЕНОТИПА**

А.И. Манухина, О.Б Брускова
Кабинет морфологических исследований.
Лаборатория минерального питания

*Изучали влияние возраста и генотипа на структурные изменения
эндокринных желез и органов иммунной системы. Установлено, что
дифференцировка клеток эндокринных желез и тимуса у свиней раз-*

ных генотипов с возрастом повышается. Однако эти процессы более эффективно протекают у помесных поросят. Высокая морфофункциональная активность эндокринных желез сопровождалась интенсивным ростом и развитием органов иммунной системы: в тимусе помесей площадь лимфоидной ткани и телец Гассала были больше, по сравнению с чистопородными животными. Полученные данные свидетельствуют о повышенной интенсивности процессов гормонообразования в эндокринных железах гибридов, которые обеспечили более высокий уровень синтеза белка в мышечной ткани, поэтому у них была выше мясная продуктивность, что согласуется с результатами контрольных убоев.

Введение

Характерными тенденциями свиноводства в мире являются повышение продуктивности животных при снижении затрат корма и труда. Биологической основой повышения мясных качеств свиней может служить межпородное скрещивание. Этот метод разведения позволяет эффективно и быстро использовать желательные человеку качества животных, накопленные в результате длительной селекции. Кроме того, комбинация различных генов обеспечивает гетерозис, т.е. усиление жизнеспособности и повышение продуктивности свиней по сравнению с исходными родительскими формами (1, 2). Однако, успех селекции обусловлен характером взаимозависимости адаптивных и продуктивных признаков животных, по которым проводят отбор. Неслучайно сейчас одной из приоритетных проблем в животноводстве становится уже не столько повышение генетического потенциала продуктивности, сколько улучшение или даже сохранение тех адаптивных свойств животных, которые они проявляют в современных условиях содержания. Отбор по многим продуктивным признакам не усиливает, а наоборот вступает в конфликт с адаптивными свойствами организма. Следует учитывать, что наблюдаемые изменения признаков есть результат отражения эффективности действия механизмов нейрогуморальной и иммунной регуляции онтогенеза у родителей и их наследования потомством. Эти механизмы в конце концов преобразуют вектор обменных процессов и обеспечивают направленное развитие признака (1, 4).

В многочисленных опытах показано, что наибольший эффект по признакам откормочной и мясной продуктивности получен при скрещивании маток крупной белой породы с хряками породы дюрок. Свины крупной белой породы обладают крепкой конституцией, хорошими репродуктивными качествами, приспособлены к кормовым и климатическим условиям России. Сочетание этих признаков у крупной белой породы с мясной продуктивностью свиней породы дюрок позволяет

получить постную свинину высокого качества (3, 4). В экспериментах (2, 3) было установлено, что двухпородные гибриды достигали живой массы на 6-9 дней раньше, среднесуточный привес у них был выше на 39-48 г, а затраты корма на 1 кг прироста ниже на 0,1-0,3 к.е. по сравнению с чистопородными свиноматками. Однако положительный эффект на продуктивность маток от скрещивания этих двух пород наблюдался не всегда (7).

Для оценки способов повышения генетического потенциала свиней возникает необходимость в разработке методов, позволяющих быстрыми темпами отбирать генотипы животных с высокой продуктивностью. Известно, что различия в генотипе у животных с разным потенциалом продуктивности находят отражение в функционировании регуляторных систем организма, к которым относятся эндокринные железы и органы иммунной системы. Установлено (8, 12), что существует положительная связь между числом соматотропцитов в гипофизе поросят и скоростью их роста. В результате гистологических исследований щитовидной железы была выявлена корреляция между высотой фолликулярного эпителия и среднесуточными привесами. По мнению авторов (12, 15) высокая активность щитовидной железы ведет к повышению интенсивности роста. Мина М.В. и Клевензаль Г.А. (8) обнаружили обратную корреляцию функциональной активности железы со скороспелостью и прямую связь с мясными качествами.

В работах (5, 14) было показано, что поджелудочная железа как орган пищеварения активно реагирует на селекцию, направленную на получение более мясных нежирных животных, своей массой и соотношением эндокринной части железы к экзокринной (показатель Ричардсона-Янга).

В настоящее время общепризнанным является факт активного участия органов иммунной системы, в частности тимуса, в качестве эффекторного и качественного звена в цепи реакции иммунного ответа (6, 6). Изучение степени развития органов иммунной системы у помесных свиней показало, что возможна индивидуальная вариабельность и функциональная изменчивость лимфоидной ткани в организме. Это может быть обусловлено разными экологическими условиями, неодинаковым влиянием среды, различной реактивностью организма (9).

Целью настоящей работы было изучение структурной организации эндокринных желез и органов иммунной системы у свиней разного возраста и генотипа.

Материалы и методы

Опыты проведены в виварии института на поросятах крупной бедой породы и помесях (крупная белая х дюрк). Были проведены

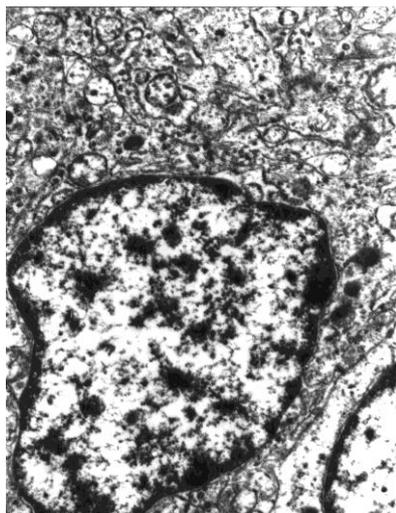
контрольные убои свиней в возрасте 30; 107 и 208 суток. Исследуемые органы (гипофиз, щитовидная и поджелудочная железы, надпочечники, тимус, брыжеечные лимфоузлы) фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, жидкости Карнуа. Парафиновые срезы окрашивали по Акимченкову, дифференцированное окрашивание типов клеток в гипофизе проводили по Хальми-Дыбану. В структурах секреторных органов определяли тинкториальные свойства, выраженность грануляции и вакуолизации цитоплазмы, а также морфологические показатели. В щитовидной железе с помощью окулярной линейки измеряли внутренний диаметр 50 фолликулов и высоту 50-ти реоцитов, рассчитывали индекс Брауна как частное от деления диаметра фолликула на высоту эпителия.

В поджелудочной железе считали количество ацинусов и островков Лангренса в 50 полях зрения каждого образца. Ширину зон надпочечников определяли методом зарисовки на миллиметровую бумагу, пользуясь трихинелоскопом. Полученный цифровой материал обрабатывали статистически (10).

Для электронной микроскопии кусочки органов фиксировали в 3%-ном растворе глутарала с последующей дофиксацией в четырехокиси осмия. После обезвоживания заливали в смесь эпон и аралдита, изготавливали срезы на ультратоме и просматривали в электронном микроскопе ЭМ-100К.

Результаты и обсуждение

При анализе ультраструктуры гипофиза 30 и 107-дневных поросят было установлено, что преобладающими клеточными элементами являются недифференцированные (главные) клетки (рис. 1), тогда как в 208-дневном возрасте выявлено наибольшее количество соматотропоцитов (рис. 2), что свидетельствует об активном синтезе соматотропного гормона в этот возрастной период. Было отмечено небольшое повышение доли ацидофилов (соматотропоциты) у помесей в 107-и 208-дневном возрасте (табл. 1).



397

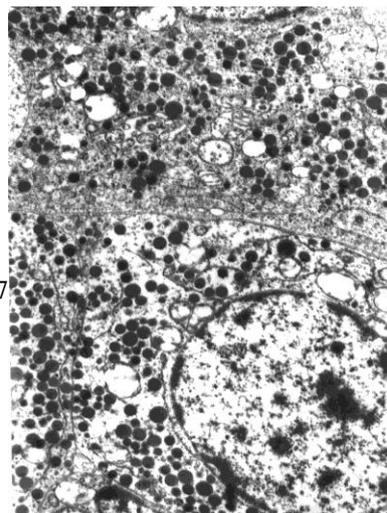


Рис. 1. Недифференцированная (главная) клетка в аденогипофизе 30-дневного поросенка. В цитоплазме отсутствуют специфические секреторные гранулы. Электроннограмма. Ув. 20000.

Рис. 2. Соматотропоциты в аденогипофизе 208-дневного поросенка. Большое количество секреторных гранул расположено в цитоплазме клеток. Электроннограмма. Ув. 14000.

Таблица 1. Процентное соотношение секреторных клеток в аденогипофизе свиней разного возраста и генотипа

Тип клеток	Крупная белая	Помеси (крупная белая х дюрок)
1	2	3
	30 суток	
Главные	52,4 ± 3,2	45,2 ± 2,8
Ацидофилы	36,6 ± 2,8	34,8 ± 2,8
Базофилы	21,0 ± 2,0	30,0 ± 1,0
<i>продолжение таблицы 1</i>		
1	2	3
	107 суток	
Главные	42,5 ± 4,1	37,4 ± 2,4
Ацидофилы	39,5 ± 1,4	41,5 ± 3,5
Базофилы	18,0 ± 2,0	20,1 ± 2,1
	208 суток	
Главные	34,2 ± 1,2	32,8 ± 2,7
Ацидофилы	39,1 ± 2,8	40,2 ± 3,8
Базофилы	26,7 ± 1,7	27,0 ± 1,7

Щитовидная железа поросят состояла из фолликулов и выстилающего их эпителия, между фолликулами располагались прослойки соединительной ткани. Высота фолликулярного эпителия с возрастом изменялась, при этом она достоверно снижалась у 107-дневных поросят (табл. 2). Установлено, что морфофункциональная активность щитовидной железы помесных поросят была выше по сравнению с крупной белой породой. Так высота фолликулярного эпителия была больше на 1-2 мкм, а диаметр фолликулов на 40-50 мкм ниже, поэтому индекс Брауна у помесей был меньше в 2 раза по сравнению с поросятами крупной белой породы. Коллоид в щитовидной железе помесей был более светло окрашен, имел многочисленные вакуоли и часто был вспенен, что свидетельствовало об интенсивной резорбции коллоида и поступлении его вначале в тироциты, а затем в кровеносное русло (рис. 3).

Таблица 2. Морфометрическая характеристика щитовидной железы свиней разного возраста и генотипа

Морфологические показатели	Крупная белая	Помеси (крупная белая x дюрок)
30 суток		
Высота фолликулярного эпителия, мкм	7,6 ± 0,9	8,0 ± 0,8
Диаметр фолликула, мкм	42,0 ± 10,4	36,9 ± 4,1
Индекс Брауна	5,6 ± 0,7	4,6 ± 0,7
107 суток		
Высота эпителия, мкм	3,4 ± 0,8	6,0 ± 1,2*
Диаметр фолликула, мкм	142,8 ± 11,2	100,8 ± 12,1*
Индекс Брауна	43,2 ± 2,9	16,8 ± 1,8
208 суток		
Высота эпителия, мкм	9,1 ± 0,7	10,0 ± 0,9
Диаметр фолликула, мкм	241,5 ± 18,2	147,4 ± 12,9*
Индекс Брауна	26,5 ± 2,8	14,7 ± 1,3

* – Разница между группами статистически достоверна (P < 0,05).

У поросят крупной белой породы преобладали крупные фолликулы с диаметром от 50 до 240 мкм с умеренно окрашенным коллоидом, в котором резорбция коллоида была незначительной (рис. 4), что указывало на более низкую, чем у помесей, активность щитовидной железы. Как известно (8, 12, 15) щитовидная железа путем изменения обмена веществ оказывает влияние на секрецию

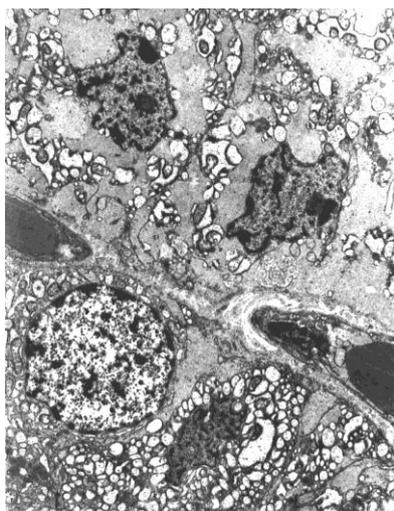


Рис. 3. Активная резорбция коллоида и поступление его в капилляры в базальной части тироцитов у помесных поросят. Электронограмма. Ув. 399

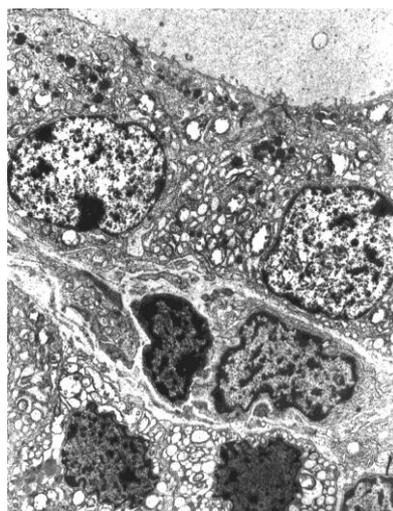


Рис. 4. Незначительная резорбция коллоида в щитовидной железе поросят крупной белой породы. Электронограмма. Ув.

пищеварительных желез. Анализ поджелудочной железы показал, что процентное соотношение стромы и паренхимы менялось с возрастом в сторону увеличения паренхимы и снижения соединительной ткани; значительных различий по этим показателям у поросят разных пород не было отмечено (табл. 3). Помесные животные превосходили крупную белую породу по количеству В-клеток в островковой ткани, размером островков и их количеству. Число островков Лангерганса было значительно выше у помесных поросят во все возрастные периоды. Клетки экзокринной части железы хорошо воспринимают кислые красители, в них отчетливо различались апикальная и базальная части. Ядра округлой или овальной формы с четко выраженными ядрышками были расположены в базальной части клеток. В апикальной зоне клеток просматривались гранулы секрета.

Таблица 3. Количественные соотношения тканевых элементов поджелудочной железы свиней разного возраста и генотипа

Тканевые элементы железы	Крупная белая	Помеси (крупная белая х дюрок)
30 суток		
Ацинусы, число на поле зрения	56,0 ± 3,02	51,4 ± 3,4
Островки Лангерганса, число на поле зрения	5,4 ± 0,67	14,3 ± 1,69
Индекс Ричардсона-Янга, %	9,6 ± 1,21	27,5 ± 2,31
107 суток		
Ацинусы, число на поле зрения	68,1 ± 2,35	62,6 ± 4,31
Островки Лангерганса, число на поле зрения	3,4 ± 0,44	12,9 ± 1,12*
Индекс Ричардсона-Янга, %	5,0 ± 0,58	21,0 ± 2,02*
208 суток		
Ацинусы, число на поле зрения	68,1 ± 3,96	60,3 ± 6,07
Островки Лангерганса, число на поле зрения	8,3 ± 0,75	18,2 ± 1,43*
Индекс Ричардсона-Янга, %	12,3 ± 1,71	30,5 ± 3,28*

* – Разница между группами статистически достоверна (P < 0,05)

Важным показателем, по которому можно судить о мясной продуктивности, является отношение экзокринной к эндокринной части железы. Чем больше процент эндокринной части, тем выше мясная продуктивность (5, 14). Из данных таблицы 3 видно, что этот показатель у помесей значительно выше во всех возрастных периодах. Установлено (2, 9), что поджелудочная железа, как орган пищеварения,

активно реагирует на селекцию, направленную на получение более мясных, нежирных животных, своей массой и показателем Ричардсона-Янга. На основании полученных и литературных данных можно заключить, что морфофункциональное развитие поджелудочной железы свидетельствует о более выраженных мясных качествах у помесных свиней, что согласуется с результатами контрольного убоя подопытных животных.

В надпочечниках поросят обеих пород наиболее развитыми были пучковая и сетчатая зоны. Клубочковая зона, ввиду узкой полосы, непосредственно прилегала к капсуле и состояла из дугообразных тяжелой клеток. В пучковой зоне встречались скопления светлых клеток, особенно в средней ее части. Одни авторы считают, что светлые клетки ответственны за секрецию разных видов гормонов (12), другие – объясняют их существование проявлением различных фаз секреторного цикла (14). Сетчатая зона, находясь непосредственно около мозгового слоя надпочечников, слабо отграничивалась от пучковой зоны, в этой зоне преобладали темные клетки. Мозговой слой представлен крупными клетками – норадреналосоцитами и адреналосоцитами. В надпочечниках поросят с возрастом увеличивалась ширина коркового и мозгового вещества (табл. 4).

Таблица 4. Морфологическая характеристика надпочечников свиней разного возраста и генотипа

Ширина зон надпочечников, мм	Крупная белая	Помеси (крупная белая х дюрок)
30 суток		
Корковое вещество	2,1 ± 0,01	2,53 ± 0,02
Мозговое вещество	0,53 ± 0,002	0,51 ± 0,02
107 суток		
Корковое вещество	2,7 ± 0,07	2,8 ± 0,001
Мозговое вещество	0,46 ± 0,001	0,48 ± 0,002
208 суток		
Корковое вещество	3,1 ± 0,05	2,9 ± 0,01
Мозговое вещество	0,85 ± 0,01	0,71 ± ,002

В тимусе преобладающими клеточными элементами являются лимфоциты (timoциты). Относительно малая популяция тимоцитов локализуется в корковом веществе долей тимуса, а более зрелая – в мозговом. Было выявлено, что относительная площадь лимфоидной ткани выше в корковом веществе, однако с возрастом ее становится меньше, а в мозговом веществе процентное содержание лимфоидной

ткани возрастает (табл. 5). В тимусе, кроме тимоцитов, обнаруживается большое количество эпителиоретикулярных клеток, причем в мозговом слое они представляют гипертрофированные эпителиальные клетки с обширной цитоплазмой и многочисленными органеллами. Отличительным критерием эпителиальных клеток служит наличие десмосом и тонофиламентов. Именно с клетками этого типа большинство авторов

Таблица 5. Относительная площадь лимфоидной ткани в тимусе свиней разного возраста и генотипа

Зоны тимуса	Крупная белая	Помеси (крупная белая х дюрок)
30 суток		
Корковое вещество	54,4 ± 1,6	56,7 ± 1,4
Мозговое вещество	27,0 ± 1,6	25,0 ± 1,2
107 суток		
Корковое вещество	58,6 ± 1,6	57,4 ± 1,8
Мозговое вещество	25,0 ± 1,2	23,6 ± 1,5
208 суток		
Корковое вещество	45,0 ± 1,8	50,4 ± 1,6
Мозговое вещество	31,7 ± 2,1	30,4 ± 2,4

связывают создание специфического тимусного микроокружения, выделяющего биологически активные вещества и индуцирующего иммунные функции лимфоцитов (6, 9). При использовании аминокислот (метионина и лизина) меченых радионуклидами, выявлено, что эпителиальные клетки тимуса активно участвуют в белковом обмене (6). В мозговом веществе эпителиальные клетки образуют тимические тельца (тельца Гассалья), которые представляют собой концентрические скопления продолговатых и веретенообразных клеток с большим ядром и слабо ацидофильной цитоплазмой. Сердцевина тельца была образована из нескольких набухших эпителиоретикулоцитов. Внутренняя часть тельца постепенно распадалась и заселялась лимфоцитами, эозинофилами. В тельцах Гассалья была выявлена положительная ШИК-реакция. Число и размер тимусных телец меняется в зависимости от породы и возраста поросят. Так, число телец Гассалья (в поле зрения микроскопа) у 107-дневных помесей было $6,7 \pm 0,9$, а поросят крупной белой породы $4,7 \pm 0,5$. Кроме того, диаметр (мкм) тимических телец был значительно выше у помесных поросят по сравнению с крупной белой породой (140 против 95).

Мнения о функции тимических телец противоречивы, их считали дегенеративными секреторными образованиями, однако их роль все еще остается неясной (14).

Заключение

Установлено, что по содержанию соматотропцитов в аденогипофизе двухпородные помеси превосходили своих чистопородных сверстников, что указывает на повышенный уровень соматотропного гормона, который в свою очередь усиливает морфофункциональную активность тироцитов и инсулиноцитов. Об этом свидетельствуют морфометрические показатели: так, высота тироцитов у помесей была больше на 1-2 мкм, а диаметр фолликулов на 40-50 мкм меньше, при этом наблюдалась активная резорбция коллоида. В поджелудочной железе обнаружено достоверное увеличение процентного содержания эндокринной части железы у помесных поросят. Высокая морфофункциональная активность эндокринных желез помесей обеспечила интенсивный рост и развитие органов иммунной системы: в тимусе было больше, по сравнению с чистопородными поросятами, телец Гассала.

Полученные данные свидетельствуют о повышенной интенсивности процессов гормонообразования в эндокринных железах помесных животных, которые обеспечили более высокий уровень синтеза белков мышечной ткани, поэтому у них была выше мясная продуктивность, что согласуется с результатами контрольных убоев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляев Д.К. Проблемы и перспективы исследований по генетике и селекции животных. Генетика, 1987, 23, 6: 937-949.
2. Горин В.П., Никищенко И.Н., Романов Ю.Д. и др. Возможность прогнозирования селекционного процесса и гетерозисного эффекта в животноводстве. Генетическая возможность отбора, подбора и методов разведения животных. М.: Колос, 1976: 85-97.
3. Джунгельбаев Е.Т. Скрещивание хряков породы дюрок и скороспелой мясной с помесными матками. Степные просторы, 1995, 11.
4. Кабанов В.Д. Откормочные и мясные качества свиней новых специализированных типов. Свиноводство, 1983, 12.
5. Ладан П.Н., Белкин Н.Н. Гистологические и цитологические исследования эндокринной части поджелудочной железы свиней разных пород. Доклады ВАСХНИЛ, 1969, 10: 10-15.
6. Ломакин М.С. Арцимович Н.Г. Гормоны и другие биологически активные вещества тимуса: структуры и функции. Иммунология, 1992, 1: 10-15.
7. Масенов Т.М., Джангильдина З.Н. Морфологические особенности семиреченской породы гибридных свиней в сравнении с исходными формами. Вопросы гибридизации копытных, М.: Наука, 1980: 116-122.
8. Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука, 1976: 261.
9. Новиков В.Д., Труфакин В.А. Органы тимолимфатической системы. Но-

- восибирский мед. институт, 1980: 30.
10. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. М.: МГУ, 1980, 207.
 11. Система разведения и программа гибридизации в свиноводстве до 1990г., 1985.
 12. Тараканов Е.И. Современное представление о функциональной морфологии гипофиза, надпочечников и щитовидной железы. Арх. гистол. эмбр., 1980, 39, 11: 102-115.
 13. Шамберев Ю.Н. Влияние гормонов на обмен веществ и продуктивность животных. Обзорная информация, М.: Колос, 1975.
 14. Das L., Maglffon I. Ago changes In the relationship among endocrine glands of swine. Irowfh, 1971, 35: 159.
 15. Witeowski A. Relationship of thyroid activity with age and liwe - weight in pig's. Rocrniki Nauk Roliilczych, ser. B. 1971, 93: 13.

ПРОДУКТИВНОСТЬ ТРЕХПОРОДНЫХ ПОРОСЯТ РАННЕГО ОТЪЕМА В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ЭНЕРГИЕЙ

С.Н Аитов, В.И. Дудин, Е.В. Пьянкова
Лаборатория витаминного питания

В опыте на двух группах 3-породных поросят (крупная белая х ландрас х гемпшир) 28-116-сут возраста изучали влияние различных уровней обменной энергии на эффективность выращивания поросят. Исследования показали, что до 116-суточного возраста лучшие показатели роста (50,1 кг против 47,5 кг в контрольной группе), оплаты корма, протеина и обменной энергии (на кг прироста), а также большее отложение протеина и жира в теле (70 и 116сут) имели поросята при скармливании повышенного на 10-15% (по сравнению с принятым на промышленных свинокомплексах) уровня обменной энергии в периоды выращивания 28-40, 41-70 и 116 сут – 13,65 и 12,8 МДж/кг, против 13,12-12,45 и 12,80 МДж/кг. Скармливание комбикорма с повышенным уровнем обменной энергии позволило получить за период доращивания 2,6 кг на одну голову дополнительного прироста живой массы.

Введение

Современное свиноводство предусматривает использование в производственном процессе гибридов. Этот прием позволяет создавать типы свиней с желаемыми мясными качествами, а также повышать продуктивность животных за счет эффекта гетерозиса. Разработка норм потребности в питательных веществах, обеспечивающих адекватное поступление их для реализации гетерозиса у гибридных свиней требует проведения специальных экспериментальных исследований. Особого

внимания требует отработка технологии кормления поросят в послеродовой период.

Условия кормления поросят при раннем отъеме отличаются от предотъемного периода по уровню и соотношению липидных компонентов рациона. В частности, в сухом остатке молока свиноматок содержание липидов составляет около 33%, а в комбикорме технологической рецептуры СК-3, на который переводятся поросята 26-30-дневного возраста после отъема, уровень «сырого» жира с учетом его добавок не превышает 4-5%. Скармливание типовых комбикормов поросятам в условиях промышленных комплексов свидетельствует о том, что в послеродовой период животные потребляют корм, несбалансированный по обменной энергии. Это приводит к непроизводительным тратам протеина корма на энергетические цели. В связи с этим, целью настоящих исследований явился поиск оптимальных условий энергетического питания поросят раннего отъема в период дорастивания.

Материал и методы

Исследования выполнены в условиях вивария института на свиньях трехпородных гибридов (крупная белая х ландрас х гемпшир). Из поросят, отнятых в 28-сут возрасте, было сформировано две группы по 15 голов по принципу парных аналогов. Животным контрольной группы скармливали комбикорма технологической рецептуры (СК-3, СК-4 и СК-5) по периодам выращивания 28-40, 41-70 и 71-116сут, соответственно. Опытная группа поросят получала комбикорма той же в основном рецептуры, но с повышенным на 5-10% по сравнению с принятым на промышленных комплексах уровнем обменной энергии за счет добавок кормового жира животного происхождения (табл. 1).

Таблица 1. *Рецептура комбикормов для поросят, %*

Ингредиенты	Комбикорма и группы животных					
	СК-3		СК-4		СК-5	
	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.	опыт
Кукуруза	–	–	20,0	–	38,8	41,0
Ячмень	50,0	46,0	30,5	46,5	15,0	36,8
Пшеница	–	14,0	–	22,0	–	–
Шрот подсолн.	–	5,0	–	5,0	–	5,1
Шрот соевый	13,0	8,0	9,0	6,0	7,0	5,0
Рыбная мука	4,0	3,0	4,0	3,0	3,5	3,5
Сухой обрат	10,0	15,0	6,0	5,0	4,0	–
Дрожжи	2,5	1,0	3,0	3,0	2,0	4,0
Отруби пшеничные	10,0	–	20,0	–	24,0	–
Травяная мука	–	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Сахар	5,0	–	1,0	–	–	–
Жир животный	2,0	4,0	1,5	4,0	0,7	–

Лецитин	0,5	–	–	–	0,25	–
Дикальций фосфат	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0
Мел	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,8
Соль	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3
Премикс КС-3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5
В 1кг комбикорма содержится:						
Обменной энергии, МДж	13,12	13,87	12,45	13,65	12,23	12,80
Сырого протеина, г	201,80	202,29	185,00	185,00	171,47	170,02
Перевар. протеин, г	171,20	178,40	152,37	155,58	133,33	139,42
Сырого жира, г	45,93	58,90	43,03	59,71	42,90	30,42
Сырой клетчатки, г	34,40	32,70	48,20	43,30	52,64	49,90
Кальция, г	10,37	10,53	10,22	9,58	8,90	9,65
Фосфора, г	8,38	8,62	8,49	8,02	8,00	7,39
Лизина, г	11,87	11,53	10,83	9,04	8,33	7,60
Метионин+цистин, г	6,36	6,85	5,87	5,73	6,03	5,59

Примечание: уровень лизина и метионина в комбикормах опытной группы выравнивали до уровня контрольной группы за счет добавок препаратов этих аминокислот

Потребление кормов и прирост живой массы учитывали по периодам выращивания молодняка и за опыт в целом, анализировали также затраты корма, протеина и обменной энергии на килограмм прироста живой массы, а также отложение жира и протеина в теле поросят. Концентрацию жира и протеина определяли в среднем образце тушки поросят (1, 2). Период доразивания молодняка продолжался до 116-суточного возраста согласно принятой на промышленных комплексах технологии.

Результаты и обсуждение

В итоге исследований установлен более интенсивный рост поросят опытной группы во все периоды (табл. 2). У животных опытной группы в меньшей степени проявлялась послеотъемная задержка роста и быстрее наступал период компенсаторного роста. Наименьший суточный прирост массы у животных контрольной группы отмечен в период 28-40 и 41-70 сут (104,2 г вместо 153,1 г и 322,4 г вместо 397,1 г) по сравнению с животными опытной группы. В следующем периоде (71-116сут) среднесуточный прирост массы животных контрольной и опытной групп был практически одинаковым и составил 635,6 г и 643,4 г, соответственно. Однако полная компенсация продуктивных функций и прироста массы не наступала за период выращивания и тенденция большей живой массы и валового прироста животных опытной группы сохранялась до конца опыта (50,10±0,96 и 42,74±0,84 соответственно, вместо 47,50±1,10 и 39,85±0,95 кг у животных контрольной группы).

Таблица 2. Прирост живой массы поросят

Показатели	Периоды выращивания, сут			
	28-40	41-70	71-116	за опыт
Живая масса, кг				
в начале периода:				
контроль	7,65±0,16			
опыт	7,36±0,15			
в конце периода:				
контроль	8,90±0,22	18,26±0,59	47,50±1,10	
опыт	9,20±0,44	20,74±0,65	50,10±0,96	
Прирост массы, кг				
контроль	1,25±0,13	9,36±0,50	29,24±0,51	39,85±0,95
опыт	1,84±0,21	11,54±0,65	29,36±0,55	42,74±0,83
Среднесуточный прирост, г:				
контроль	104,2±9	322,4±14	635,6±19,4	452,84±10,78
опыт	153,1±10	397,1±19	643,4±6,75	485,68±9,20

При одинаковом потреблении (94,94 и 95,14 кг) затраты кормов и протеина в целом за опыт были ниже у поросят опытной группы (табл. 3). Особенно заметно это в возрасте 28-40сут, когда затраты корма, протеина и обменной энергии на килограмм прироста живой массы составили у животных опытной группы – 1,18 кг, 0,24 кг и 16,43 МДж соответственно, вместо 1,89 кг, 0,38 кг и 24,88 МДж у животных контрольной группы.

Таблица 3. Потребление и затраты корма, протеина и энергии у поросят

Показатели	Периоды выращивания, сут			
	28-40	41-70	71-116	за опыт
Потреблено кормов, кг				
контрольная	2,37	23,47	69,10	94,94
опытная	2,18	25,30	67,66	95,14
кг корма/кг прироста:				
контрольная	1,89	2,50	2,36	2,38
опытная	1,18	2,19	2,30	2,22
Потреблено протеина, кг				
контрольная	0,48	4,36	11,85	16,70
опытная	0,44	4,68	11,50	16,60
Протеин, кг/кг прироста:				
контрольная	0,38	0,46	0,40	0,42
опытная	0,24	0,40	0,39	0,39
Потреблено обм. энергии, МДж:				
контрольная	31,10	292,2	845,1	1168,4
опытная	30,24	345,00	866,0	1241,6

Обменная энергия МДж/кг прироста:				
контрольная	24,88	31,22	28,84	29,32
опытная	16,43	29,89	29,50	29,05

В период 41-70 сут затраты корма, протеина и обменной энергии на килограмм прироста были существенно ниже у животных опытной группы – 2,19 кг, 0,40 кг и 29,89 МДж соответственно, вместо 2,50 кг, 0,46 кг и 31,22 МДж у животных контрольной группы. В завершающий период выращивания (71-116 сут) эти показатели были практически на одном уровне и составили – 2,36 кг, 0,40 кг и 28,84 МДж/кг у животных контрольной группы и 2,30 кг, 0,39 кг и 29,50 МДж/кг у животных опытной группы. За период дорастивания (28-116 сут) у животных опытной и контрольной групп затраты корма на килограмм прироста составили соответственно 2,22 и 2,38 кг, протеина – 390 и 420 г и обменной энергии 29,05 и 29,32 МДж, соответственно.

С целью определения состава прироста живой массы, т.е. выяснения на какие цели были использованы организмом свиней основные питательные вещества корма (для синтеза липидов или белков тела) в конце опыта из каждой группы было убито по 5 голов. Анализ средних образцов гомогенатов тушек на содержание протеина и общих липидов в теле показал, что по процентному и в особенности абсолютному содержанию протеина и общих липидов, поросята опытной группы существенно превышали своих сверстников из контрольной группы (табл. 4).

Таблица 4. Содержание протеина и общих липидов в гомогенате тушек поросят

Показатели	Группы животных	
	контрольная	опытная
Протеин: %	17,5	18,03
г	4515,0±110,2	4940,2±184,4
Общие липиды: %	16,74	17,7
г	4318,9±120,1	4849,8±145

За период выращивания от 28 до 116 сут в теле поросят опытной группы отложилось протеина на 9,4% и жира на 12,3% больше, чем у животных контрольной группы. Из этих данных следует, что больший абсолютный прирост живой массы у свиней опытной группы за период выращивания (42,74 кг против 39,85 кг живой массы у животных контрольной группы) обусловлен большим отложением в теле как протеина, так и липидов. У поросят на рационах с повышенным уровнем энергии отмечено также большее тотальное отложение протеина по отношению к жиру.

Следует также отметить целесообразность использования при выращивании поросят 3-х породных гибридов, отнятых в 28-сут возрасте, комбикорма типа СК-3 с ячменно-пшеничной зерновой основой с содержанием в 1 кг корма 13,87 МДж обменной энергии, 15% сухого обрата, 5,4-6,0% жира (в том числе 4% за счет кормового) и 20,2 сырого протеина; комбикорма типа СК-4 с той же зерновой основой, 13,7 МДж обменной энергии, 6,0% жира, 5% сухого обрата и 18,5% сырого протеина; в возрасте 71-116 сут комбикорма типа СК-5 с кукурузно-ячменной основой, содержащие 12,8 МДж обменной энергии, 17,02% сырого протеина, без включения сухого обрата и жира. Поросята 71-116 сут возраста эффективно используют источники энергии не липидной природы и способны удовлетворять потребности в энергии за счет большего потребления корма и источников ее углеводной природы. Из комбикорма СК-5 при использовании его в указанном возрасте (старше 70 сут) следует исключить сухой обрат (4%) с заменой шротами по уровню протеина, что позволяет экономить 1,75 кг этого дефицитного корма на каждую выращенную голову, даже при увеличении его уровня в СК-3 до 15%.

Выводы

1. При скармливании помесным поросятам раннего отъема (28сут) комбикормов технологической рецептуры в период доращивания (до 116 сут), но с повышенным уровнем обменной энергии – 13,87-13,65, 12,80 МДж/кг (в том числе 4% за счет кормового жира в период 28-40 и 41-70 сут) против 13,12, 12,45 и 12,23 МДж/кг обменной энергии в контрольной группе отмечено увеличение среднесуточного прироста в конце периода выращивания на 7,2% , снижение затрат корма на кг прироста на 6,73% и протеина на 7,15%. Затраты обменной энергии на кг прироста были практически одинаковы в обеих группах – 29,05 и 29,32 МДж/кг. Отложение протеина и липидов было выше на 9,4% и на 12,3% у животных опытной группы.

2. За период доращивания животные, потреблявшие повышенный уровень обменной энергии дополнительно дали 2,06 кг прироста живой массы и было сэкономлено 1,75 кг сухого обрата на одну голову.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folch S., Les M. A supple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 1957, 226: 447-504.
2. Лукашик Н.А., Талицин В.А. Определение общего азота способом полумикрокельдаля. Зоотехнический анализ кормов. М.: Колос, 1965, 59-61.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОЛОНГИРОВАННЫХ ФОРМ

Е.М. Колоскова, В.А. Галочкин
Лаборатория иммунобиотехнологии

*Рассматриваются методы приготовления препаратов пролонгированного действия модельных низкомолекулярных веществ с использованием синтетических и природных полимерных матриц на основе производных целлюлозы, этилцианакрилата и сывороточного альбумина. Отработаны режимы создания пролонгированных форм синтетического аналога гонадолиберина, обеспечивающие различную динамику высвобождения в условиях *in vitro*. Приводятся гипотетические механизмы физиологического действия модификаций разработанных микрокапсулированных форм пролонгированных препаратов сурфагона. Обсуждаются возможные пути их использования для повышения продуктивности и регуляции воспроизводительной функции сельскохозяйственных животных.*

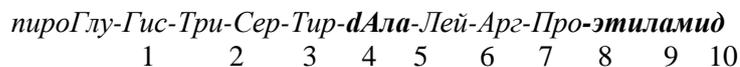
Введение

Современные возможности иммунологии, биотехнологии, физико-химической и молекулярной биологии позволяют решить комплекс сложных проблем, связанных с созданием препаратов пролонгированного действия (ППД) биологически активных веществ (БАВ) белковой природы (1), в частности релизинг-факторов – гормонов гипоталамуса, индуцирующих синтез и секрецию гипофизарных гормонов. Из них наиболее полно изученным является ЛГ/ФСГ релизинг-фактор, называемый в литературе люлиберином, фолиберином, гонадолиберином (далее мы будем называть его ЛГ-РФ). В начале 70-х годов расшифрована его первичная структура (2) и осуществлен полный химический синтез, а к настоящему времени получены синтетические аналоги, физиологическая активность которых значительно превышает активность нативного гормона. Манипулируя уровнем содержания этого регуляторного пептида в организме, можно целенаправленно воздействовать на воспроизводительную функцию человека и животных, нормализуя, стимулируя или угнетая ее. ЛГ-РФ – это декапептид со следующей аминокислотной последовательностью:

пироглу-Гис-Три-Сер-Тир-Гли-Лей-Арг-Про-Гли-NH₂
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Синтетический пептид данной последовательности обладает полной физиологической активностью нативного гормона. Вследствие

действия эндопептидаз, разрывающих связи между 5-6 и 6-7 аминокислотными остатками, период его биологической жизни в организме не превышает нескольких минут. Замещение l-формы Гли[6] на d-форму делает его труднодоступным для гидролиза ферментами. Введение этиламида в 10-м положении дополнительно продлевает время жизни молекулы, препятствуя разрыву 9-10 связи карбоксипептидазой. Отечественный аналог ЛГ-РФ – сурфагон, имеющий в 6-м положении d-Ала и этиламинированный в 10-м, значительно устойчивее к действию протеаз и показал повышенное сродство к рецепторам гонадотропных участков гипофиза:



В России ежегодно синтезируется и используется несколько килограммов сурфагона. ЛГ-РФ млекопитающих не имеет видовых различий, что позволяет широко использовать гормон и его аналоги. Успешные испытания микрокапсульных систем стероидных гормонов на основе полиоксикарбоновых кислот, созданных с целью контрацепции (3), послужили импульсом для изготовления аналогичных форм ЛГ-РФ. При подкожной имплантации препарата «Zoladex» в полилактид-полигликолидной матрице понижалось содержание эстрогенов в крови самок-крыс, и они находились в стадии длительного диэструса. Эффективность ППД синтетического пептида подтверждена экспериментами на различных видах животных и клиническими испытаниями (4-7), в которых, помимо выраженного угнетения роста раковых опухолей, наблюдали уменьшение уровня тестостерона, прекращение сперматогенеза, уменьшение размера семенников, ингибирование функции яичников.

Что представляют собой такие микросферы? Полученные методом фазового разделения, это в конечном виде – сферические частицы размером до 50 мкм, 2% веса которых составляет пептид и 98% – полилактид-ко-гликолид (53:47 мол. %). Показано, что 33 мг пептида, заключенные в описанные микрокапсулы, способны относительно равномерно выделяться из них в течение месяца со скоростью около 25 мкг в сутки. Эти микрокапсулы, суспендированные в 2% водном растворе карбоксиметилцеллюлозы с 1% Tween 20, свободно инъецируются внутримышечно шприцем с внутренним диаметром иглы 0,5-1 мм. Масса яичников, предстательной железы, семенников, опухоли простаты через месяц после начала эксперимента у крыс с ППД ЛГ-РФ были меньше, чем у животных, получавших ежедневно двукратно инъекции аналогичной дозы непродолжительного препарата (8).

Материал и методы

Метод изготовления *полиакриламидных микросфер* (ПААГ МС) и динамика выделения из них иммобилизованных низкомолекулярных веществ в зависимости от плотности матрицы и природы высокомолекулярного наполнителя описаны нами ранее (12), поэтому остановимся на рассмотрении других способов иммобилизации.

Альбуминовые микросферы готовили из бычьего или свиного сывороточного альбумина (БСА и ССА МС) (НПФ «Мобитек») по способу (9) с нашими модификациями. Для получения МС разной плотности и степени сшивки готовили маточный раствор альбумина (40%) в буфере (0,02 М фосфатно-солевой буфер, рН 7-7,4). В качестве сшивающего реагента использовали глютаровый альдегид (ГА) (25%, «Sigma»). МС различной плотности и степени сшивки характеризовали отношением БСА/ГА (x/y, где x – процентная концентрация альбумина, y – процентная концентрация ГА в конечном растворе).

Растворы всех компонентов и масло, содержащее 1-1,5% Span 85, охлаждали. Для получения 1 мл общего объема МС во флакон вносили рассчитанное количество маточного раствора альбумина, добавляли растворы иммобилизуемых соединений, доводили буфером до конечного объема 1 мл, вносили необходимое количество 25% раствора ГА, быстро перемешивали. Вносили масло, интенсивно встряхивали и эмульсию перемешивали еще 30-40 минут при комнатной температуре. По окончании реакции смесь с затвердевшими МС 1 час выдерживали при комнатной температуре, после чего осадок отмывали от масла и лиофилизировали. Размер частиц не превышал 50 мкм.

Для изготовления *целлюлозных МС* использовали ацетилцеллюлозу (АЦ) (50-55% связанной уксусной кислоты) и ацетилфталилцеллюлозу (АФЦ) (18-23% ацетильных и 30% фталильных групп, растворимую при рН выше 7) (ВИИСС, химический завод, г. Владимир).

МС получали методом выпаривания растворителя. Изготавливали МС с различным соотношением АЦ/АФЦ компонентов (по весу): 90/10, 75/25, 50/50, 25/75. Готовили 10% растворы целлюлоз в ацетоне. К рассчитанным количествам растворов АЦ и АФЦ добавляли требуемое количество порошка БАВ, получали однородную суспензию. При постоянном перемешивании к суспензии приливали 10-кратное количество (по объему) вазелинового масла, содержащего 1-1,5% Span 85 и продолжали перемешивание до полного удаления запаха ацетона и затвердевания МС. Полученную суспензию центрифугировали и частицы отмывали от масла.

Для получения *полиэтилцианакрилатных МС* использовали свойство алкилцианакрилатов полимеризоваться в присутствии электрондонорных частиц (10).

Навеску сурфагона в 5 мг растворяли в 50 мкл 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,4 и добавляли 2 мл ацетона. К 2 мл ацетона по каплям добавляли рассчитанное количество ЭЦА (100-200 мкл). Суспензию сурфагона и раствор ЭЦА смешивали. Раствор переносили в вазелиновое масло, содержащее 1% Span 85. Эмульсию перемешивали в течение времени, необходимого для полного испарения ацетона. Суспензию центрифугировали, осадок отмывали гексаном. Размер ПЭЦА-микросфер не превышал 5 мкм.

Результаты и обсуждение

Опыты *in vitro* по определению скорости выделения иммобилизованных веществ проводили при комнатной температуре в 0,05 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 с 0,05% NaN₃. Для изучения выделения низкомолекулярных веществ (бромфенолового синего (БФС) и сурфагона), навеску МС помещали в диализный мешок с размером пор до 6 кДа. Буфер в системе меняли каждые двое суток. О скорости выделения иммобилизованных соединений судили по изменению их концентраций в буфере, измеряемых через определенные промежутки времени.

При иммобилизации низкомолекулярных соединений в ПААГ МС проблему биодegradации матрицы решали, «нагружая» низкосшитую матрицу высокомолекулярным веществом, биосовместимым с организмом и способным к выведению из него. Высокомолекулярный наполнитель подбирали таким образом, что скорость выделения иммобилизационного вещества существенно замедлялась из-за химического взаимодействия между наполнителем и биологически активным веществом (11). В основу действия других препаратов пролонгированного действия, рассматриваемых нами, заложены иные принципы.

Динамика выделения низкомолекулярных веществ из альбуминовых микросфер. Выясняли влияние концентрации альбумина и степени его сшивки на скорость выделения низкомолекулярных веществ. МС получали сшиванием белка в присутствии иммобилизуемого вещества. Испытывали МС состава (БСА/ГА): 30/1, 20/1, 20/3. Нагрузка БФС составляла 0,1%, сурфагона – 3% веса сырого препарата. Контролем был диализ навески БФС или сурфагона. Условия проведения эксперимента описаны выше. Динамика выделения БФС и сурфагона представлена в таблице 1. Предварительно установили, что альбуминовые МС без пептида в данной буферной системе и при комнатной температуре не дают продуктов, проникающих через мембрану с размером пор 6 кДа и поглощающихся при длине волны 280 нм.

Кривая выделения БФС имела почти одинаковый наклон, что свидетельствует о равномерности скорости высвобождения красителя, зависимой от плотности матрицы и степени ее сшивки. Изменение кон-

центрации альбумина с 20 до 30% при одном и том же количестве ГА (1%) делало матрицу менее жесткой, а ее поры более эластичными. Скорость выделения БФС в таких МС была выше. Увеличение количества альдегида от 1 до 3%, при одной и той же концентрации альбумина, напротив, жестко закрепляло матрицу, уменьшая диффузию иммобилизованного вещества.

Таблица 1. Динамика выделения бромфенолового синего (1) и сурфагона (2) из БСА МС различной плотности и степени сшивки глютаровым альдегидом

ППД	% выделения						
	время, сутки						
	0.	2.	4.	6.	8.	10.	12.
1-БСА/ГА 20/3	0	5	8	10	14	17	
1-БСА/ГА 20/1	0	7	10	14	17	23	
1-БСА/ГА 30/1	0	9	13	17	21	30	
2-БСА/ГА 20/3	0	14	20	28	31	37	40
2-БСА/ГА 20/1	0	15	27	34	38	40	47
2-БСА/ГА 30/1	0	23	33	38	45	48	55

Аналогичные результаты получены и для сурфагона. Но, несмотря на несколько большую, чем у БФС, молекулярную массу (1200 Да), скорость выделения пептида была выше. Так 30/1 МС за 12 суток освободили более половины исходного количества пептида, тогда как за этот срок выделилось 30% красителя. Кинетика выделения двух низкомолекулярных веществ существенно различалась. Если скорость выхода БФС была линейна на протяжении всего эксперимента, то для сурфагона, высокая вначале, скорость замедлилась спустя 2 суток.

Следует учитывать, что какая-то часть сурфагона, изначально внесенного в раствор альбумина, способна ковалентно пришиваться к белку после введения сшивающего бифункционального агента – глютарового альдегида. Будучи связанным с матрицей, такой пептид не способен к самостоятельному выведению из микросфер, и только гидролиз образовавшейся амидной связи освобождает иммобилизованное вещество. С другой стороны, в условиях организма такой препарат, содержащий как пролонгированный сурфагон, так и его конъюгат с альбумином, может быть чрезвычайно интересен с практической точки зрения. Если вначале у нас действует ППД, обеспечивая в течение длительного времени постоянно высокую концентрацию аналога ЛГ-РФ в крови, и, тем самым, тормозя репродуктивную функцию опытных животных, то на стадии биодegradации БСА МС решающая роль принадлежит фрагментам альбумина с иммобилизованным пептидом, фактически конъюгатам сурфагона. Последнее обстоятельство способствует

выработке антител на нативный ЛГ-РФ и вызывает описанную ранее иммуностерилизацию животных (11).

Последнего эффекта можно избежать, незначительно изменив процедуру приготовления самих микросфер. Достаточно заранее приготовленные «пустые» БСА МС заданной концентрации и степени сшивки известными способами очистить от масляной фазы, непрореагировавших компонентов матрицы и лиофилизировать. После чего микросферы помещаются в 10-20% раствор сурфагона из расчета, что тот почти полностью составляет объем МС до лиофилизации. 8-10 часов состав хранится при 4-8°C, после чего производят отмывку буфером. Обычно таким образом удается «загрузить» 20-50% исходного пептида в зависимости от буфера, концентрации вещества и времени инкубации.

Сравнение динамики высвобождения разных веществ из матриц одинакового состава демонстрирует индивидуальность каждого случая иммобилизации, обусловленную совокупностью всех химических взаимодействий иммобилизованного вещества с материалом и характеристиками матрицы.

Заключение

На основании представленных результатов экспериментов подтверждена принципиальная возможность создания различных препаратов пролонгированного действия сурфагона, обеспечивающих разную кинетику выделения и сроки поддержания повышенной концентрации пептида в организме. Иными словами, речь идет о создании пролонгированной формы препарата с управляемой скоростью высвобождения активного вещества. Экстраполируя полученный материал на условия *in vivo*, при соответствующей доработке формы, уместно полагать о потенциальной возможности создания полифункционального препарата, с помощью которого, в зависимости от состава, доз, сроков и схем использования, открывается возможность достижения нескольких производственных целей: нормализация воспроизводительной функции животных, синхронизация охоты, стимулирование или ингибирование овуляции, обратимая или необратимая стерилизация, управление поведенческими реакциями животных и повышение их продуктивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee V.H.L., ed. Peptide and protein drug delivery. Marsel Dekker Inc., N.-Y., 1990.
2. Schally A.W., Arimura A., Kastin A.J. et al. GnRH - on polypeptide regulates secretion of luteinizing and folliclestimulating hormones. Science, 1971, 173, 5: 1036-1038.

3. Beck L.R., Cowsar D.R., Lewis D. et al. A new long acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone. *Fertil. Steril.*, 1979, 31: 545-551.
4. Peeling W.B. Phase III studies to compare goserelin (Zoladex) with orchiectomy and with diethyl stilbestrol in treatment of prostatic carcinoma. *Urology*, 1989, 5: 45.
5. Robinson M.R.G., Denis L., Machler G et al. An LHRH analogue (Zoladex) in the management of carcinoma of prostate: a preliminary report comparing daily subcutaneous injections with monthly injections. *Eur. J. Surg. Onc.*, 1985, 11: 159-165.
6. Walker K.J., Turkes A.O., Zwink R. et al. Treatment of patients with advanced cancer of the prostate using a slow-release (depot) formulation of LHRH agonist ICI 118630. *J. Endocrinol.*, 1984, 103: R1-R4.
7. Ward J.A., Furr B.J.A., Valcassia B. et al. Prolonged suppression of rat testis function by a depot formulation of Zoladex, a GnRH agonist. *Int. J. Androl.*, 1989, 10: 478.
8. Redding T.W., Schally A.V., Tice T.R. et al. Long acting delivery systems for peptides: inhibition of rat prostate by controlled release of [dTrp]6-LHRH from injectable microcapsules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81: 5845-5848
9. Yapel A.F. Albumin microspheres: heat and chemical stabilization. In: *Methods in Enzymology*, 1985, 112: 3-18.
10. Douglas S.J., Davis S.S., Itlum L. Biodistribution of poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles in rabbit. *Int. J. Pharm.*, 1986, 34: 145-152.
11. Галочкин В.А., Эрнст Л.К., Триндо Л.И. и др. Иммунобиотехнологический подход к регуляции репродуктивной функции, обмена веществ и продуктивности животных. *Сельскохозяйственная Биология*, 1994, 2: 3-19.
12. Колоскова Е.М., Галочкин В.А. Регулирование скорости выделения низкомолекулярных биологически активных веществ из препаратов пролонгированного действия образованием интерполимерных комплексов. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивности животных. Сборник науч. трудов ВНИИФБиП. Боровск, 1999, 146-152.

СОДЕРЖАНИЕ

Биотехнологические аспекты животноводства

<i>Дворянчиков Г.А., Иванова Л.Б., Шевченко В.Г.</i> Получение генноинженерной конструкции, включающей ген гранулоцит колони–стимулирующего фактора человека и фланкирующие районы гена $\alpha s1$ –казеина быка.....	3
<i>Рябых В.П., Трубицина Т.П., Сапунова Е.Г., Ниязов Н.С., Маркина Л.И.</i> Анализ факторов, влияющих на эффективность получения потомства свиней из зигот, микроинъецированных генно-инженерными конструкциями.....	10
<i>Рябых В.П., Попова Е.А., Дворянчиков Г.А., Иванова Л.Б.</i> Анализ зависимости частоты интеграции трансгена от стадии развития зигот у мышей.....	32
<i>Попова Е.А., Кривохарченко А.С., Рябых В.П., Вильянович Л.И.</i> Анализ факторов, влияющих на жизнеспособность и приживляемость эмбрионов мышей, полученных из зигот, микроинъецированных генноинженерными конструкциями.....	42
<i>Маленко Г.П.</i> Культивирование эмбрионов крупного рогатого скота in vitro.....	49
<i>Симоненко В.Н., Корохов Н.П., Шевченко В.Г.</i> Оценка видовой специфичности микросателлитных локусов У 07736 (1.1), X 81898 (1.3) и У 07735 (42.3).....	72
<i>Шмидт Т.Ю., Шевченко В.Г.</i> Микросателлиты – маркеры локусов хозяйственно полезных признаков крупного рогатого скота.....	81
<i>Алёшин В.В., Карпушина С.Г., Тараканов Б.В.</i> Интерференция вегетативной и конъюгативной репликации и ее связь с межвидовой передачей плазмид.....	91
Пищеварение, обмен веществ и воспроизводство у жвачных животных	
Харитонов Е.Л., Материкин А.М., Мысник Н.Д.	
Количественные аспекты обмена азота и аминокислот в пищеварительном тракте жвачных и новые подходы к оценке обеспеченности аминокислотами их организма из кормов рациона.....	102
<i>Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П., Лазаренко В.П., Надальяк Е.А.</i> Особенности использования энергии корма у коров в начальный период лактации.....	123
<i>Решетов В.Б.</i> Физиолого-биохимические аспекты выведения энергии с органическими веществами мочи у коров.....	134

<i>Лысов А.В., Панюшкин Д.Е., Мартюшов В.М., Вострова Л.Н., Гарицина Н.А.</i>	
Влияние различного уровня кормления лактирующих коров на поступление углеводно-липидных метаболитов в кровь портальной вены.....	145
<i>Гарицина Н.А., Панюшкин Д.Е., Заболотнов Л.А., Лысов А.В., Вострова Л.Н., Шмельков А.Е.</i>	
Поглощение липидных метаболитов молочной железой коров при разном уровне питания.....	161
<i>Сапунов М.И., Матющенко П.В., Макара З.Н., Корнеева Р.И., Медведев И.К.</i>	
Зависимость удоев коров от содержания и функциональной активности секреторных клеток в молочной железе в разные фазы лактации.....	171
<i>Сапунов М.И., Андрейчук Е.В., Плишкина К.И., Макара З.Н., Мартынова А.С., Кожжакина А.В., Медведев И.К.</i>	
Влияние лактогенных и глюкокортикоидных гормонов на активность компонентов плазминовой системы в молочной железе коров.....	177
<i>Матющенко П.В., Мурашов А.И.</i>	
Породные различия жирнокислотного состава молочного жира у холмогорских и черно-пестрых коров и их помесей с голштинами.....	186
<i>Панюшкин Д.Е., Лысов А.В.</i>	
Эскизная модель образования основных жирных кислот молочного жира.....	191
<i>Токарев Ю.Т., Токарев Т.Ю.</i>	
Обоснование использования математических функций для описания зависимости удоев молока от стадии лактации и стельности.....	210
<i>Калашник В.И., Кузнецов С.Г., Омельченко В.Д.</i>	
Минеральный обмен в организме молочных коров при различных условиях питания.....	218
<i>Матвеев В.А., Дворецкая Т.Н.</i>	
Сравнительный анализ гормонального статуса у коров после отела и телят в первые дни жизни.....	229
<i>Бахитов К.И.</i>	
Совершенствование способа регуляции воспроизводительной функции у коров после отела.....	238
<i>Долгов И.А., Материкин А.М., Долгова С.И.</i>	
Микробиологическая оценка качества кормов, обработанных формальдегидом.....	243
Физиология, морфология и биохимия животных, выращиваемых на мясо	
<i>Еримбетов К.Т., Кальницкий Б.Д., Аитова М.Д., Фофана Н.В., Матющенко П.В., Баранов А.П., Павлова О.М.</i>	
Количественные аспекты метаболизма мышечных белков и липидов жировой ткани у бычков разного направления продуктивности.....	253
<i>Павлова О.М.</i>	
Концентрация общих липидов и обмен высокомолекулярных жирных кислот в организме бычков герефордской и холмогорской пород в за-	261

висимости от возраста.....	
Матвеев В.А., Галочкина В.П., Баранова И.А.	
Функциональная активность инсулярного аппарата поджелудочной железы у бычков герефордской и холмогорской пород.....	269
Галочкин В.А., Сухих В.Ф., Софронова О.В.	
Неспецифическая резистентность и состояние иммунной системы у бычков на откорме при различной обеспеченности субстратами процессов биосинтеза компонентов мяса.....	280
Харитонов Л.В., Матвеев В.А., Харитонова О.В.	
Участие аминокислот в регуляции межточного обмена телят.....	286
Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Алиев С.А.	
Производственные испытания эффективности применения лактоамиловорина при выращивании телят.....	296
Манухина А.И., Тараканов Б.В., Николичева Т.А.	
Субмикроскопические изменения органов иммунной системы кроликов при использовании в рационе разных доз лактоамиловорина.....	306
Тараканов Б.В., Николичева Т.А.	
Эффективность применения штамма <i>lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i> Ibr 33/90 при выращивании телят.....	313
Долгов И.А., Долгова С.И.	
Влияние <i>str. bovis</i> на биоценоз кишечника телят.....	321
Долгов И.А., Долгова М.С., Калашиник В.И.	
Влияние лиофилизации молочно-кислых бактерий на их активность и жизнеспособность.....	326
Кузнецов С.Г., Дудин В.И., Матвеев В.А., Манухина А.И., Аитов С.Н., Омельченко В.Д., Аитова М.Д., Волобуева Р.А., Комкова Е.Е., Крюков О.А.	
Биохимические тесты раннего прогнозирования мясных и откормочных качеств свиней.....	331
Дудин В.И., Аитов С.Н., Рябых Т.Е., Жарова Т.В., Комкова Е.Е.	
Новые способы физиологического и биохимического контроля обеспеченности свиней витаминами.....	345
Аитова М.Д., Еримбетов К.Т., Кузнецова Е.И., Харитонова О.В.	
Особенности азотистого метаболизма и формирования мышечной ткани у свиней разного потенциала продуктивности.....	355
Кузнецов С.Г., Омельченко В.Д., Калашиник В.И.	
Минеральный статус и формирование костной ткани у молодняка свиней разного генотипа.....	362
Галочкин В.А., Колоскова Е.М., Софронова О.В.	
Сравнительная оценка антиоксидантных свойств селенопирана.....	370
Брускова О.Б.	
Биологическая функция селена в организме животных.....	376
Манухина А.И., Брускова О.Б.	
Структурные изменения эндокринных желез и органов иммунной системы свиней разного возраста и генотипа.....	386
Аитов С.Н., Дудин В.И., Пьянкова Е.В.	
Продуктивность трехпородных поросят раннего отъема в условиях различной обеспеченности энергией.....	395

Колоскова Е.М., Галочкин В.А

Иммобилизация и изучение кинетики высвобождения низкомолекулярных биологически активных веществ из различных пролонгированных форм.....

401

CONTENTS

Biotechnological aspects of animal-breeding

Dvoryanchikov G.A., Ivanova L.V., Shevchenko V.G. Development of gene-engineer construction included granulocyte colonial gene, i.g. human stimulate factor, and flanked regions of bovine as1-casein gene.....	3
Ryabich V.P., Trubitsina T.P., Sapunova E.G., Niyasov N.S., Markina L.I. Analysis of the factors affected reproductive efficiency of sow from zygotes microinjected by gene-engineer construction.....	10
Ryabich V.P., Popova E.A., Dvoryanchikov G.A., Ivanova L.B. Analysis of dependence of transgenetic integration frequency on stage of zygotic development in mice.....	32
Popova E.A., Krivocharchenko A.S., Ryabich V.P., Vilyanovich L.I. Analysis of the factors affected embryonic viability and acclimatization in mice received from zygotes which were microinjected by gene-engineer constructions.....	42
Malenko G.P. Cultivation of bovine embryos in vitro.....	49
Simonenko V.N., Korohov N.P., Shevchenko V.G. Estimation of specific differences in microsatellite Y07736(1.1); X81898(1.3) and Y07735(42.3) locuses.....	72
Shmidt T.U., Shevchenko V.G. Microsatellites ave markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance of cattle.....	81
Alyeshin V.V., Karpushina S.G., Tarakanov B.V. Interference of vegetative and conjugative replication and its relation to plasmid transmission among species.....	91
<i>Digestion, metabolism and reproduction in ruminants</i>	
Haritonov E.L., Materikin A.M., Mysnik N.D. Quantitative aspects of nitrogen and amino acid metabolism in digestive tract in ruminants, and the new approaches to estimation of amino acid availability from diet components.....	102
Agafonov V.I., Reshetov V.B., Volobuev V.P., Lazarenko V.P., Nadalyak E.A. Features of feed energy use in cows at the beginning of lactation.....	123
Reshetov V.B. Physiological and biochemical aspects of energy output with organic urine matters in cows.....	134
Lysov A.V., Panjushkin D.E., Martushov V.M., Vostrova L.N., Garanina N.A. Effect of different levels of feeding on entering of carbohydrate and lipid metabolites to portal vein blood in lactation cows.....	145

Garanina N.A., Panjushkin D.E., Zabolotnov L.A., Lysov A.V., Vostrova L.N., Shmelkov A.E.	
Mammary utilisation of lipid metabolites at different levels of feeding in cows.....	161
Sapunov M.I., Matushenko P.V., Makar Z.N., Korneeva R.I., Medvedev I.K.	
Dependence of cow milk production on contents and functional activity of secretory cells in mammary gland at different periods of lactation.....	171
Sapunov M.I., Andreychuk E.V., Plishkina K.I., Makar Z.N., Martynova A.S., Kozhakina A.V., Medvedev I.K.	
Effect of lactogene and glucocorticoid hormones on component activity of plasmin system in cow mammary gland.....	177
Matushenko P.V., Murashov A.I.	
Breed differences in amino acid content of milk fat in Kholmogore and black-white cows and their crosses with Golstein.....	186
Panjushkin D.E., Lysov A.V.	
Outline model of fatty acid production in milk fat.....	191
Tokarev U.T., Tokarev T.U.	
Substantiation of use of mathematical functions for describing of dependence of milk production on lactation stage and calving.....	210
Kalashnik V.I., Kuznetsov S.G., Omelchenko V.D.	
Mineral metabolism in dairy cows at different feeding.....	218
Matveev V.A., Dvoretzkaya T.N.	
Comparable analysis of hormonal status in cows after calving and in calves at first days of life.....	229
Bahitov K.I.	
Improvement of the method for regulation of reproductive function in cows after calving.....	238
Dolgov I.A., Materikin A.M., Dolgova S.I.	
Microbiological estimation of quality of feeds treated with formaldehyde.....	243
Physiology, morphology and biochemistry of meet animals	
Erimbetov K.T., Kalnitsky B.D., Aitova M.D., Fofana N.V., Matushenko P.V., Baranov A.P., Pavlova O.M.	
Quantitative aspects of metabolism of muscular protein and lipid in adiposal tissue in steers with different type of productivity.....	253
Pavlova O.M.	
Total lipid concentration and high molecular fatty acid metabolism in Hereford and Kholmogore steers depending on age.....	261
Matveev V.A., Galochkina V.P., Baranova I.A.	
Functional activity of insular pancreas apparatus in Hereford and Kholmogore steers.....	269
Galochkin V.A., Suhih V.F., Sofronova O.V.	
Non-specific resistance and immune system status in fattening steers at different substrate providing of meet component biosynthesis.....	280
Haritonov L.V., Matveev V.A., Haritonova O.V.	

Amino acid contribution to regulation of metabolism in calves.....	286
Tarakanov B.V., Nikolicheva T.A., Aliev S.A.	
Production trials on efficiency of lactoamylovorin used in growing of calves.....	296
Manuhina A.I., Tarakanov B.V., Nikolicheva T.A.	
Submicroscopic changes in immune system organs in rabbits when the different doses of lactoamylovorin are used in diets.....	306
Tarakanov B.V., Nikolicheva T.A.	
Efficiency of use of Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum LBR 33/90 strain on growing calves.....	313
Dolgov I.A., Dolgova S.I.	
Effect of Str.bovis on intestinal biocenosis in calves.....	321
Dolgov I.A., Dolgova M.S., Kalashnik V.I.	
Effect of lactic-acid bacteria liophilization on their activity and viability.....	326
Kuznetsov S.G., Dudin V.I., Matveev V.A., Manuhina A.I., Aitov S.N., Omelchenko V.D., Aitova M.D., Volobueva R.A., Komkova E.E., Krukov O.A.	
Biochemical tests for early prediction of meet and fattening properties in sows.....	331
Dudin V.I., Aitov S.N., Ryabich T.E., Zharova T.V., Komkova E.E.	
New methods for physiological and biochemical control of vitamin providing in porcine.....	345
Aitova M.D., Erimbetov K.T., Kuznetsova E.I., Haritonova O.V.	
Features of nitrogen metabolism and development of muscular tissue in sows of different production potential.....	355
Kuznetsov S.G., Omelchenko V.D., Kalashnik V.I.	
Mineral status and development of bone tissue in different genotype pigs.....	362
Galochkin V.A., Koloskova E.M., Sofronova O.V.	
Comparative estimation of antioxidant properties in selenopiran.....	370
Bruskova O.B.	
Biological function of selenium in animal body.....	376
Manuhina A.I., Bruskova O.B.	
Structural changes in endocrine glands and immune system organs in different aged and genotyped sows.....	386
Aitov S.N., Dudin V.I., Pyankova E.V.	
Production in three-breeding early weaned pigs at different levels of energy nutrition.....	395
Koloskova E.M., Galochkin V.A.	
Immobilization and study of release kinetics of low-molecular biologically active matters from different prolongic forms.....	401

***Современные проблемы биотехнологии и
биологии***

продуктивных животных.
Сборник научных трудов. Том XXXIX.

*Утверждено к печати Ученым советом ВНИИ физиологии,
биохимии и питания с.-х. животных.*

Редактор издания *В.Д. Кальницкая*
Компьютерная верстка *Т.В. Жарова*
Полиграфическое исполнение *А.В. Бочаров*

Издательство ВНИИ физиологии, биохимии и питания
сельскохозяйственных животных.

249010 Калужская обл., г. Боровск, ВНИИБиП с.-х. животных.
тел. 546-64-15